

Membránfehérjék vizsgálata vörösvértesteken, a kapcsolódó genetikai variánsok azonosítása és jellemzése

Doktori értekezés

Zámbó Boglárka

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sarkadi Balázs, PhD, professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Enyedi Balázs, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Goda Katalin, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nyitray László, DSc, egyetemi tanár

Dr. Rónai Zsolt, PhD, egyetemi docens

Budapest

2018

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	5
2.1 A biológiai membránok felépítése, membrán fehérjék és membrán transzporterek	5
2.2 Membrán transzporterek a vörösvértesteken	7
2.2.1 Elsődlegesen aktív transzporterek.....	8
2.2.1.1 A Na^+-K^+ ATPáz.....	8
2.2.1.2 PMCA típusú ATPázok.....	10
2.2.1.3 ABC-típusú transzporterek	15
2.2.2 SLC-típusú, másodlagosan aktív vagy facilitált diffúzióra képes transzporterek	21
2.2.3 Aquaporinok	22
2.2.4 Ioncsatornák.....	22
2.3 Előzetes eredmények: vörösvértest membrán expressziós vizsgálatok.....	24
2.4 Mitől függhet egy plazmamembrán-fehérje szintje? Transzkripció, transzlációs, trafficking és lebontó folyamatok szabályozása.	27
3. CÉLKITŰZÉSEK	32
4. MÓDSZEREK	33
4.1 Membránfehérjék mérése vörösvértestekből készített ghostokon.....	33
4.2 DNS izolálás vérből, szekvenálás és genotipizálás	36
4.3 DNS konstrukciók létrehozása	37
4.4 Emlős sejtvonalak fenntartása, transzfekciója, jelölése és mérése áramlási citométeren	39
4.5 Vörösvértest membránpreparátum készítése és Western-blot.....	42
4.6 Kalcium transzport mérések vörösvértesteken	43
4.7 Statisztika.....	44
5. EREDMÉNYEK	45
5.1 Az alacsonyabb PMCA4b fehérjeszintet okozó genetikai variánsok nyomában	45
5.1.1 PMCA4b fehérjeszintek meghatározása áramlási citométerrel a vörösvértesteken.....	45
5.1.2 Western-blot analízis vörösvértest membránpreparátumokon	45
5.1.3 Az ATP2B4 gén exon-szekvenálása és qPCR vizsgálata.....	47
5.1.4 Kalcium efflux mérések vörösvértesteken	51
5.1.5 Dual-luciferáz mérések a haplotípus hatásának vizsgálatára	53
5.2 Az alacsonyabb ABCG2 fehérjeszintet okozó genetikai variánsok nyomában	54
5.2.1 ABCG2 fehérjeszintek meghatározása áramlási citométerrel köszvényes és kontroll emberektől származó vörösvértesteken	54
5.2.2 Az ABCG2 qPCR genotipizálás és Sanger-szekvenálás eredmények....	55
5.2.3 Membrán expressziós vizsgálatok emlős sejteken.....	57

5.2.4 Funkcionális vizsgálatok emlős sejteken.....	59
5.2.5 A sérült ABCG2 fehérje kisegítése a membránba kémiai chaperonok segítségével.....	61
6. MEGBESZÉLÉS	62
6.1 A PMCA4b-t kódoló ATP2B4 génben talált haplotípus jellemzői.....	62
6.1.1 A haplotípus nem okoz változást a fehérje szekvenciájában	62
6.1.2 A haplotípus védettséget biztosít maláriával szemben	62
6.1.3 A PMCA4b szerepe a maláriában.....	63
6.1.4 A haplotípusnak csak az eritroid sejtvonalakban van hatása az expresszióra.....	64
6.2 Az ABCG2 gén és a talált variánsok.....	66
6.2.1 Az ABCG2 szerepe a köszvényben	66
6.2.2 Egyéb ABCG2 mutációk a kaukázusi populációban	68
6.2.3 Az M71V és R383C ABCG2 mutációk szerkezeti hatása	69
6.2.4 Kis molekulák használata a sérült ABCG2 kisegítésére	71
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	73
7.1 A vörösvértest expressziós mérések alkalmasak eddig nem azonosított variánsok megtalálására	73
7.2 A vörösvértest expressziós mérések prognosztikai vagy diagnosztikai szempontból is hasznosak lehetnek	73
7.3 A vörösvértest expressziós mérések limitációi.....	74
7.4 A PMCA4b-t érintő haplotípus jelentősége.....	74
7.5 Az ABCG2-ben azonosított SNP-k, mutációk jelentősége	75
8. ÖSSZEFOGLALÁS	76
9. SUMMARY	77
10. IRODALOMJEGYZÉK	78
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	103
11.1 Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	103
11.2 Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények	103
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	104

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4-PBA	4-phenyl butyric acid	HPLC	high performance liquid chromatography
5'UTR	5' untranslated region		
ABC	ATP-binding cassette	HRP	horseradish peroxidase
ADME-Tox	absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity	Hst	Hoechst 33342
		HTS	high throughput sampler
		IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
ALD	adrenoleukodystrophy		
APC	allophycocyanin	IRES	internal ribosome entry site
ATP	adenosine triphosphate	KO	knock out
BSA	bovine serum albumin	LD	linkage disequilibrium
CBD	calmodulin binding domain	MAF	minor allele frequency
CD	cluster of differentiation	MD	molecular dynamics
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	MDR	multidrug resistance
CF	cystic fibrosis	NBD	nucleotid binding domain
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	NCBI	The National Center for Biotechnology Information
		NIH	National Institutes of Health
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	OAT	organic anion transporter
		PBS	phosphate buffered saline
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	PCR	polymerase chain reaction
		PE	phycoerythrin
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid	PFIC	progressive familial intrahepatic cholestasis
EGR1	early growth response protein 1	PIC	preinitiation complex
		PMCA	plasma membrane calcium ATPase
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	Pol II	RNS-polimeráz II
		PR	promoter
FACS	fluorescence activated cell sorting	PV	parasitophorous vacuole
		PVM	parasitophorous vacuolar membrane
FBS	fetal bovine serum	rER	rough endoplasmatic reticule
FITC	fluorescein isothiocyanate		
FSC	forward scatter	SLC	solute carrier
GFP	green fluorescent protein	SNP	single nucleotide polymorphism
GLUT	glucose transporter		
H1	haplotype 1	SSC	side scatter
H2	haplotype 2	SUR	sulfonylurea receptor
H3	haplotype 3	TMD	transmembrane domain
HDAC	histone deacetylase	WGA	wheat germ agglutinin
HDI	histone deacetylase inhibitor		
HDL	high density lipoprotein		

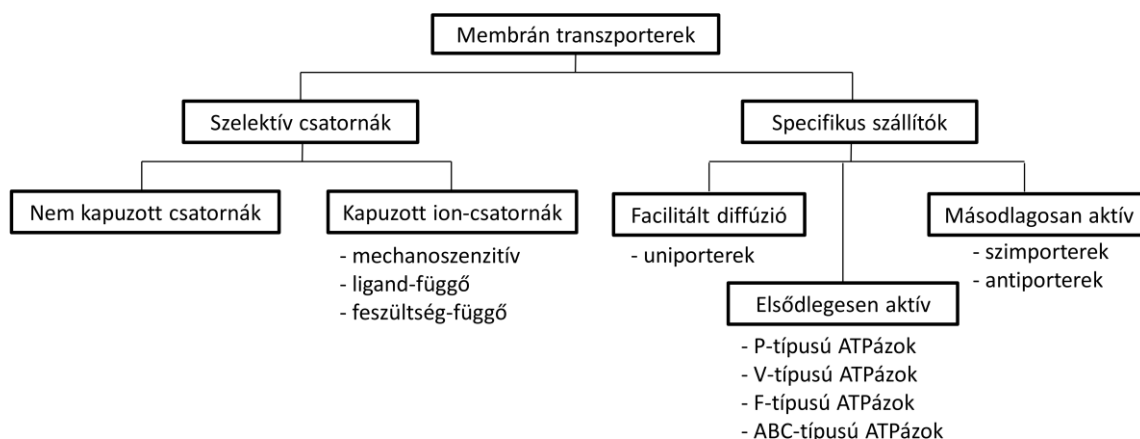
2. BEVEZETÉS

2.1 A biológiai membránok felépítése, membránfehérjék és membrán transzporterek

A biológiai membránok alapvetően lipidekből és membránfehérjékből állnak. A membránok kompartmenteket hoznak létre a sejten belül és a sejtek felszínén. Ioncsatornák és transzporterek révén biztosított az ionok és poláros anyagok kontrollált átjutása egyik kompartmentből a másikba (1). A legtöbb élőlényben a gének 20%-30%-a membránfehérjéket kódol, tehát a humán genomban körülbelül 10.000 membránfehérje DNS szekvenciája található meg (2). Ezek a fehérjék lehetnek membrán kapcsolt és integráns membránfehérje típusúak. Az integráns membránfehérjék hidrofób kölcsönhatások révén szorosan a membránba ágyazottak, lehetnek perifériálisak vagy átívelhetik a membránt (transzmembrán típus). Állhatnak amfipatikus α -hélixekből, valamint lehetnek β -hordó struktúrájúak. Az utóbbi szerkezeti típus a bakteriális külső membránban jellemző, illetve az ebből filogenetikailag származott membránokban, például a mitokondriumok külső membránjában (3). Igen széleskörű funkcióval rendelkeznek a membránfehérjék, képezhetnek sejtkapcsoló struktúrákat, lehetnek enzimek, transzportálhatnak különféle ionokat és anyagokat, felismerhetnek bizonyos szignálokat, a citoskeletonnak és az extracelluláris mátrixnak lehetnek a rögzítő pontjai, és peptid hormonok receptoraiként is szolgálhatnak. Ezért nem meglepő, hogy a jelenlegi becslések szerint a jövőben akár a gyógyszerek 50%-a is membránfehérjéket célozhat meg (4).

A membrán transzporterek képesek a membránon átjuttatni kisebb-nagyobb molekulákat, peptideket, ionokat. A transzport típusát tekintve beszélhetünk szelektív csatornákról (pórusokról), illetve specifikus szállító transzporter fehérjékről (1. ábra). A szelektív csatornák általában egy specifikus iont, molekulát képesek egyik oldalról átengedni a másik oldalra. A legtöbb csatorna esetén létezik olyan gát-mechanizmus, mellyel a fehérje nyitható és zárható, ezzel szabályozva az adott molekula átjutását (mechanoszenzitív, ligand-függő, feszültség-függő csatornák). A transzport minden esetben passzívan, a gradiensnek megfelelően történik (5). Ezzel szemben a specifikus szállító transzporterek esetén a csatorna egyik oldala nyitva, a másik zárva van. Ebben az állapotban lehetővé válik specifikus kölcsönhatást kialakítani az adott ion vagy

molekula és a transzporter nyitott oldala között, mely azután a fehérje szerkezeti átrendeződését követően képes a fehérjén belül haladni és a másik oldalt nyitott állapotban pedig elhagyni, ezzel lehetővé téve akár a gradienssel ellentétes irányú haladását is (6). Ebben a csoportban megkülönböztethetünk facilitált diffúzióra képes uniportereket, elsődlegesen, és másodlagosan aktív membrán transzportereket. Az SLC (solute carrier) típusú transzporterek közé a másodlagosan aktív vagy facilitált diffúzióra képes transzportereket soroljuk összefoglalóan. Facilitált diffúzió esetén a fehérje specifikus kölcsönhatást alakít ki a szállítandó molekulával, de a hajtóerőt itt is a koncentráció gradiens adja, ebből kifolyólag ezek a pumpák képesek akár egyik szövetben az egyik irányba, míg egy másik szövetben a másik irányba transzportálni ugyanazt az anyagot (pl. GLUT2 fehérje a májban a glikolízis/glükoneogenezistől függően kétféle irányban is működhet) (7). Az elsődlegesen aktív membrán transzporterek ATPázok, azaz közvetlenül az ATP energiáját felhasználva képesek a membrán egyik oldaláról a másikkra átjuttatni a szállítandó anyagokat. Itt négy csoportot különböztethetünk meg, a P-típusú, V-típusú, F-típusú, és ABC-típusú ATPázokat (8). A harmadik csoportját képezik a specifikus szállító fehérjéknek a másodlagosan aktív transzporterek, melyek egyszerre több iont/molekulát képesek mozgatni, általában az egyiket a gradiensének megfelelő irányba (ezt a gradienst korábban általában egy elsődlegesen aktív pumpa már létrehozta), amely biztosítja az energiát a másik ion/molekula gradiensnek ellentétes irányú mozgatásához (9). Ezek lehetnek szimporterek (azaz egy irányba történik a két ion/molekula szállítása) vagy antiporterek (azaz ellentétes irányú a transzport a két ion/molekula esetében).



1. ábra: A membrán transzporterek csoportosítása. A membrán transzportereket aszerint, hogy kölcsönhatást alakítanak-e ki a transzportált anyaggal, szelektív csatornákra és specifikus szállító fehérjékre bonthatjuk. A szelektív csatornák között megkülönböztetünk nem kapuzott csatornákat (pl. aquaporinok), illetve különféle mechanizmussal kapuzott ioncsatornákat (pl. mechanoszenzitív PIEZO1 csatorna). A specifikus szállító transzport lehet facilitált diffúzió (pl. GLUT transzporterek), illetve történhet elsődlegesen (pl. ABC-transzporterek) és másodlagosan aktív (különféle szim- és antiporterek) transzporterek segítségével.

2.2 Membrán transzporterek a vörösvértesteken

A humán vörösvértestekre jellemző, hogy érésük során sejtmagjukat és belső membrán struktúráikat elveszítik. Az őket borító egyedüli sejtmembránban számos membránfehérje megtalálható, köztük sokféle transzporter is. A legfrissebb eritrocitákon végzett membrán proteóm vizsgálatok alapján úgy tűnik, számos, klinikai vonatkozásban is fontos membránfehérje van köztük, melyekről eddig azt gondolták, hogy csak egy specifikus szövetre, szervre jellemző. Mivel a vörösvértestek könnyen hozzáférhetőek nem invazív módszerrel, illetve a vérben nagy számban fordulnak elő, ezért a vörösvértest membránfehérjék vizsgálata alkalmas lehet gyors és egyszerű diagnosztikai vagy prognosztikai módszerek kifejlesztésére (10).

Ebben a fejezetben a teljesség igénye nélkül kitérek a membránfehérjék főbb csoportjaira, különös tekintettel a vörösvértestek membránfehérjeire, azok szerepére normális és kóros vörösvértestekben, bizonyos betegségekben játszott szerepükre,

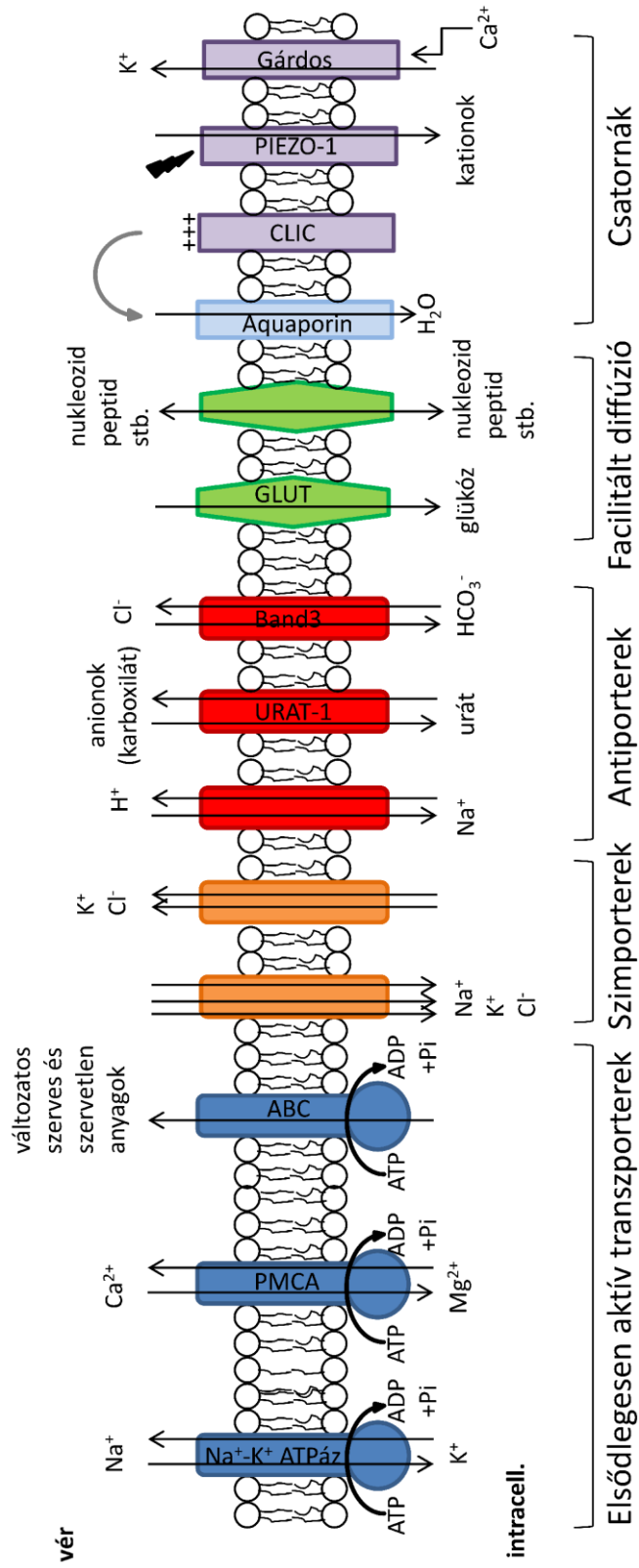
valamint a legfrissebb kutatások alapján néhány érdekességet is bemutatok velük kapcsolatosan. A vörösvértesteken megtalálható fontosabb membrán transzportereket és szubsztrátjaikat a 2. ábrán foglaltam össze (11).

2.2.1 Elsődlegesen aktív transzporterek

Az elsődlegesen aktív transzporterek az ionkoncentráció különbség létrehozásában és különféle anyagok grádienssel ellentétes irányú transzportjában vesznek részt, melyhez az energiát az ATP hasítása biztosítja. A vörösvértest membránja permeábilis a vízre és a legtöbb anionra, míg a kationokra gyakorlatilag átjárhatatlan, így azok csak specifikus csatornákon és transzportereken juthatnak át a membránon. Általánosan jellemző, hogy jelentősen eltérő koncentrációban vannak jelen a kationok az extracelluláris és intracelluláris térben (pl. alacsony kálium, magas nátrium és kalcium koncentráció kívül), ezt a különbséget pedig ezek az elsődlegesen aktív transzporterek hozzák létre (11).

2.2.1.1 A Na^+-K^+ ATPáz

Az egyik fontos ATP hajtotta pumpa a vörösvértesteken a Na^+-K^+ ATPáz, mely a Na^+ kifelé és a K^+ befelé szállításában vesz részt, ezzel fenntartva a szükséges iongradienst, a térfogat- és vízháztartás megfelelő egyensúlyát (12). A vörösvértestek esetén a sejt térfogatának és bikonkáv alakjának fenntartásában van szerepe. A mikropillárisokban a sejthalak megváltozását biztosítják. A fehérje nem megfelelő működése a vörösvértestek ozmoregulációjának, deformabilitásának csökkenésével jár, mely megfigyelhető magas vérnyomásban szenvedőknél, koszorúér betegségekben, illetve Diabetes mellitusban is (13).

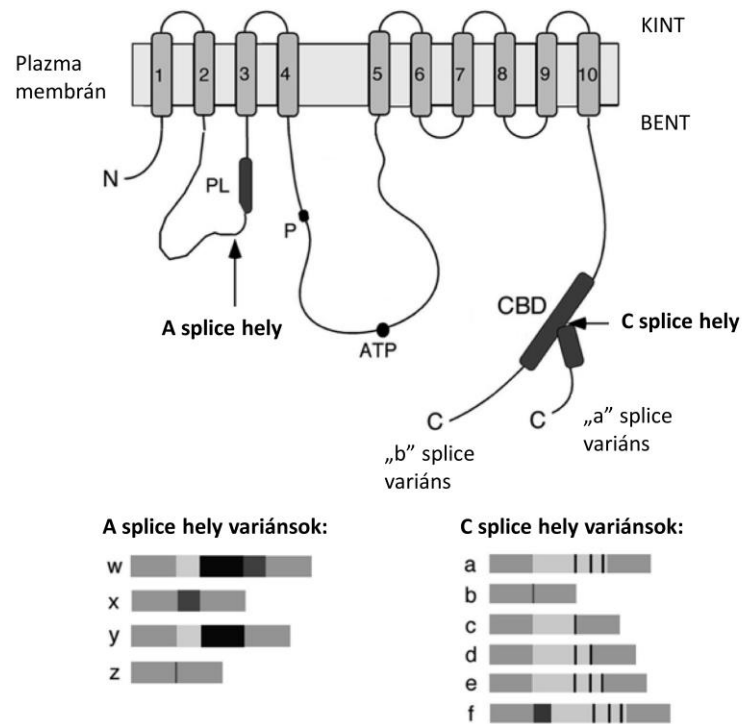


2. ábra: A vörösvértesten jellemző membránfehérjék főbb típusai példákkal. A vörösvértest egyedüli membránjában számos olyan fehérje megtalálható, melyek mérése diagnosztikai vagy prognosztikai szempontból érdekes lehet. (*Pasini és mtsai (11) alapján, módosítva*)

2.2.1.2 PMCA típusú ATPázok

A PMCA típusú kalcium/magnézium transzportáló ATPázoknak a vörösvértestek mikrokapillárisokban fellépő fizikai stresszre adott válaszában (14), a térfogat szabályozásban (15), a szénészenciájukban (16) és az eryptózisában (17) van szerepe. Az ATP energiáját felhasználva képes a sejtből kifelé transzportálni egy Ca^{2+} -ot, miközben befelé egy Mg^{2+} -ot mozgat.

A PMCA-k a P-típusú ATP-ázok közé tartoznak, melyek nevüket a foszforilált intermedier állapotról kapták (18). Egyetlen polipeptid láncból állnak, három globuláris domént alkotva, és esetükben 10 darab transzmembrán hélix íveli át a membránt (3. ábra) (19). A PMCA-kat az emlősökben négy gén kódolja (emberben: *ATP2B1*, *ATP2B2*, *ATP2B3*, *ATP2B4*), melyek különböző kromoszómákon helyezkednek el (emberekben: 12q21.3, 3p25.3, Xq28, és 1q32.1 rendre, 4. ábra, (19)).



3. ábra: Az emlős PMCA típusú fehérjék topológiai felépítése és alternatív splicing lehetőségei. A 10 darab membrán-átívelő régiót számozással jelöltem. Az N-terminálist (N), C-terminálist (C), az első loopon elhelyezkedő foszfolipid kötőhelyet (PL), az ATP hidrolízisben részt vevő aszparaginsavat (P), az ATP-kötő helyet (ATP), a C-terminális calmodulin kötő domént (CBD) tüntettem fel. A két alternatív splicing helyet nyilak mutatják, alul az alternatív splicing során létrejövő variánsok szerepelnek. A C-splice hely a leolvasási keret eltolódását okozza, amely a kétféle hosszúságú C-terminális farkat eredményezi (a és b). A szürke különféle árnyalataival jelölt téglalapok az alternatívan összeállt exonokat jelölik. A C-splice hely esetén az a, c, d, e variáns különféle donor helyet használ ugyanazon az exonon belül (fekete csíkok), az a variánsban a teljes exon megtalálható. *(kép forrása: Strehler, E. (19), módosítva)*

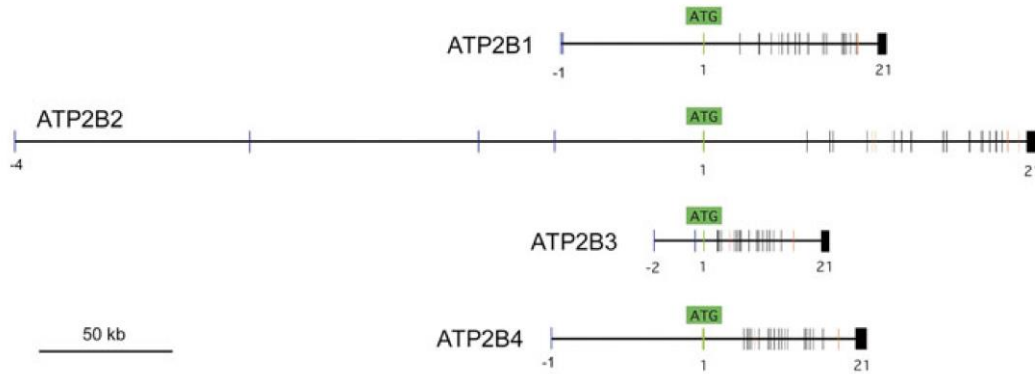
A négyféle izoforma (a géneknek megfelelően PMCA1-4) közül a PMCA1 és a PMCA4 minden szövetben, szervben megtalálható. A gyorsan aktiválódó PMCA2 és PMCA3 leginkább az ideg- és izomsejtekben jellemző (20). A PMCA1 kiütése egerekben már embrionális korban letalitást okoz (21, 22). A simaizmokban és a hímivarsejtekben nagy számban a PMCA4 izoforma található meg, így ennek a

fehérjének a kiütése egerekben elsősorban a simaizmok nem megfelelő működésével és a hím állatok sterilitásával járt (21, 22)

A PMCA fehérjékre jellemző a változatos mRNS splicing és a transzkripció folyamatának sokrétű szabályozása. A két fő alternatív splicing hely az ún. A és C splice hely, melyek alternatív használatának következtében elvben összesen több mint 30 féle variáns keletkezhet a négy pre-mRNS-ből. Ténylegesen eddig 20 féle variánst azonosítottak különféle szövetekben. Az A-splice hely esetén például a PMCA4 fehérje 301. aminosavja után alternatív exonok beépülésével hosszabb loop keletkezhet. Az x variáns esetén az eltérő donor hely használatnak köszönhetően a 301. aminosavtól kezdődően beépül egy 12 aminosavas szakasz, ami a z variánsban hiányzik. A C-splice hely esetén egy plusz exon beépülése során a leolvasási keret is eltolódik. Az a variáns rövidebb C-terminális régiót eredményez összehasonlítva a b variánssal. A c, d, e variánsok az a variánshoz hasonlóak, csak eltérő donor helyeket használnak az alternatív exon beépülése során (3. ábra). Tovább gazdagítják a PMCA fehérjéket a mutációk, polimorfizmusok és a poszttranszlációs módosulások is (19). Ezeknek a mechanizmusoknak köszönhetően a PMCA fehérjék egyes szövetekben mutatott, valamint a fejlődés során időben tapasztalható mennyisége jelentősen ingadozik, ami szerepet játszhat a szabályozó mechanizmusok finomhangolásához szükséges változó intracelluláris kalcium-ion szintek kialakításában.

A PMCA fehérjéket kódoló *ATP2B* gének transzkripció szintű szabályozása jelenleg nem teljesen tisztázott, de mindegyik gén esetében jellemző legalább egy, nem kódoló 5'UTR exonikus régió, valamint az ezt követő hosszú, több tíz kilobázisnyi intronikus szakasz, melyek sokféle transzkripciós faktor bekötődését biztosítják (4. ábra) (19). Ismert, hogy az *ATP2B1* gén esetén a fehérje expressziója simaizom sejtekben G1/S fázis alatt csökken, mivel a c-myc transzkripciós faktor a gén promóter régiójához köt (23). Azt is kimutatták, hogy a D-vitamin elősegíti sokféle szövetben és sejtben az *ATP2B1* transzkripcióját (24–27). A myc transzkripciós faktor szerepet játszik az *ATP2B4* gén átírásának csökkentésében B-limfociták fejlődése során (28). Az *ATP2B2* gén struktúrája különösen érdekes. Összesen eddig négy különböző alternatív promóterét mutatták ki. Az alternatív promóter használat következtében a fehérjéből például több keletkezik az emlőmirigyekben, mint az idegsejtekben (29). Emellett az

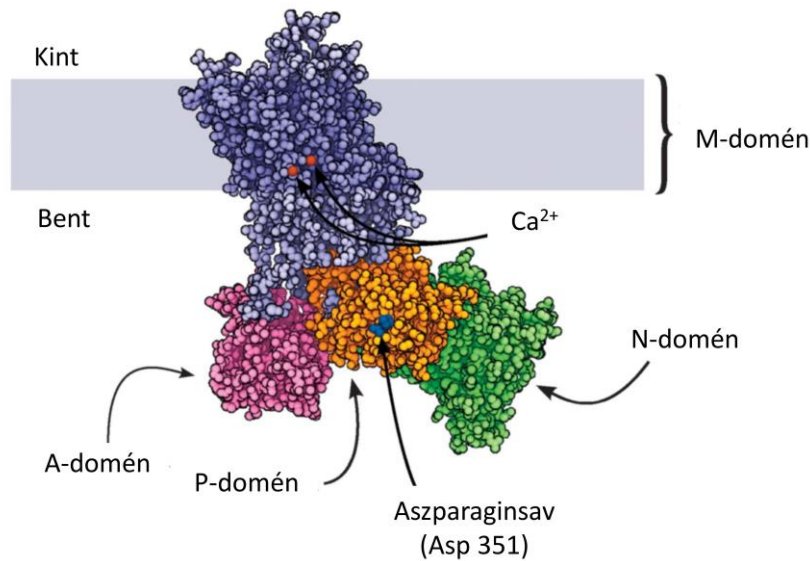
EGR1 képes bekötődni a gén CpG szigetének környékére, mely az egyik típusú (α) promóter aktiválódását váltja ki (30). A többi gén esetén sem lehet kizárni, hogy többféle alternatív promóterrel vagy enhancerrel rendelkeznek, melyek különféle szövetekben, különféle stimulusok hatására aktiválódnak.



4. ábra: A PMCA-típusú fehérjét kódoló gének felépítése. Az ATP2B típusú gének mindegyike rendelkezik legalább egy, 5'UTR-t kódoló exonnal, melyet általában hosszú intronok követnek. Az első exon (zöld) ezen az ábrán minden esetben az iniciációs metionint (ATG) kódoló exon, vagyis a fehérje átírás kezdete. A negatív számokkal jelölt exonok az 5'UTR szakasz részei az mRNS-en. A piros vonalak az alternatív exonokat jelzik. (kép forrása: Strehler, E. (19), módosítva)

A PMCA fehérjék szerkezeti szempontból nagyon hasonlítanak egymásra. Homológia vizsgálatok alapján (31, 32) négy fő doménal rendelkeznek (5. ábra) (33) és egy egyedi, csak a PMCA fehérjékre jellemző rendezetlen C-terminális régióval.

Az M-domén a 10 darab transzmembrán hélixet foglalja magában, melyek a kalcium-ionok számára alakítanak ki csatornát. Az N-domén köti meg az ATP-t, melynek γ -foszfátja a P-domén egyik konzervált aszparaginsavjára (Asp 351) kerül rá a nagyenergiájú P-intermediert létrehozva, ahonnan a P-típusú ATPázok nevüket kapták (18). Az A-domén a többi három domén mozgását koordinálja a pumpa ciklus alatt. Az A-domén és a C-terminális régió alternatív splicingja alakítja ki a fehérjék rendkívül sokféle variánsát, melyek kisebb-nagyobb mértékben különböznek egymástól aktivitásukat tekintve (lásd fentebb, 3. ábra) (19).



5. ábra: A P-típusú ATP-ázok általános doménstruktúrája. Szürkével a membránt jelöltem, piros gömbök a transzportálandó kalcium-ionok helyét mutatja, az aszparaginsav, amely a P-doménen foszforilálódik a fehérje működése során kékkel van jelölve. (kép forrása: Levrik és mtsai (33) módosítva)

A PMCA fehérjék aktiválódása Ca^{2+} -calmodulin függő, a kötőhelye a fehérje C-terminális, rendezetlen régiójában található meg (34). Kalcium nélkül ez a C-terminális fark a fehérje aktív helyére köt, ezzel akadályozva az ATP bekötődését a fehérjéhez. Amint az intracelluláris kalcium szint megemelkedik, a Ca^{2+} -calmodulin képes bekötődni és lefejteni a C-terminális farkat erről a régióról, mely ezután a kalcium-ionok és az ATP számára hozzáférhetővé válik (35).

A calmodulin kötő doménen (CBD) kívül a PMCA C-terminálisa több, fehérje-fehérje kölcsönhatásban résztvevő vagy regulációs szekvenciát tartalmaz: DxxD kaspáz hasítóhelyet (36, 37), savas lipid kötő helyet (38, 39), több kináz foszforilációs helyét (40, 41), di-leucin lokalizációs szignált (42), PDZ-domén kötő szekvenciát (43). Ezek közül a CBD és a kaspáz 3 kötőhely mindegyik PMCA-ra jellemző, míg a többi – az alternatív splicingnak köszönhetően – csak bizonyos variánsokra jellemző. A C-terminális savas lipid kötőhelyen kívül az első loopon is található egy foszfolipid

érzékeny régió (44), mely a PMCA fehérjék aktivitását szabályozza (lásd fentebb, 3. ábra).

A PMCA-k a vörösvértestekben kerültek elsőként leírásra (45–47), majd az első PMCA-t vizsgáló kinetikai és enzim aktivitás megismerésére irányuló kísérletek is ezeken a sejteken történtek (48–50). A vörösvértestekre a PMCA fehérjék két izoformája jellemző, a PMCA1 x/b és a PMCA4 x/b (továbbiakban PMCA1b és PMCA4b), melyek közül az utóbbi van nagy mennyiségben jelen (51–53). Bizonyos patológiás esetekben (örökletes hemolitikus vérszegénységben, maláriában és Diabetes mellitusban) a kalcium szint emelkedése és a PMCA gátlása figyelhető meg a vörösvértesteken (54, 55).

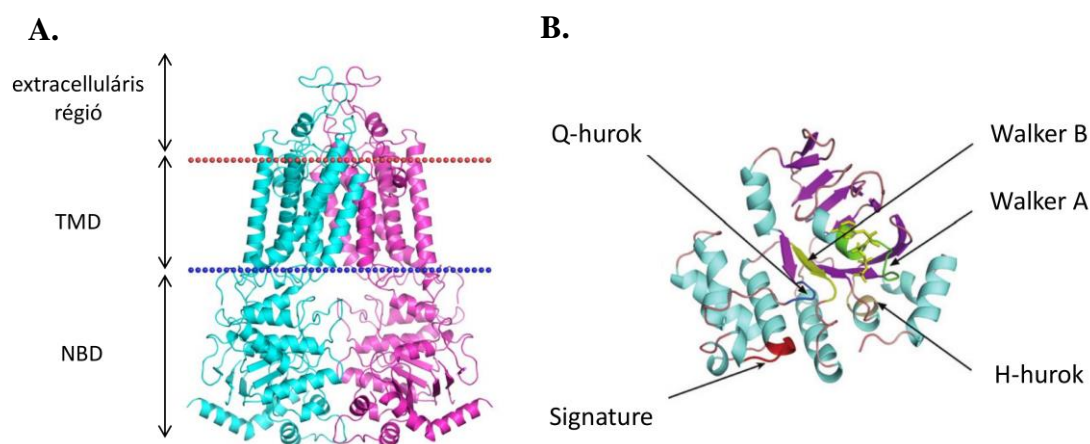
2.2.1.3 ABC-típusú transzporterek

Az ATP-kötő kazetta (ATP-binding cassette - ABC) típusú fehérjék egy ősi szupercsaládot alkotnak, melyek megtalálhatóak a prokariótáktól kezdve a növényeken, gombákon, élesztőkön át az állatokig (56, 57). Igen népes családról van szó, az *E. coli* genomja által kódolt fehérjék csaknem 5%-át teszik ki (58). Az emberben eddig 48 tagját azonosították, melyeket hét csoportba sorolnak be (betűkóddal A-tól G-ig). Ezekben a csoportokban közös a konzervált ATP-kötő régió, a Walker A és B motívum jelenléte, melyek az ATP megkötésében vesznek részt (59). Emellett a legtöbb ABC fehérje rendelkezik transzmembrán régióval is, azonban van néhány kivétel (ABCE és ABCF család). Ezek a citoszolikus fehérjék funkciójukat tekintve nem transzporterek, hanem a fehérjeszintézis szabályozásában vesznek részt (60, 61).

A szupercsalád tagjai rengeteg különféle endogén anyagot képesek átjuttatni a membránokon keresztül; inorganikus anionokat, fém ionokat, aminosavakat, peptideket, cukrokat, sokféle hidrofób vegyületet, metabolitot, zsírsavakat, koleszterint, nukleozidokat (57). Emellett igen fontosak a különféle farmakológiai szerek abszorpciójában, eloszlásában, metabolizálásában, exkréciójában és az általuk kiváltott toxicitás erősségében is (úgynevezett ADME-Tox folyamatokban) (62).

Felépítésüket tekintve két fő domén jellemzi az ABC transzportereket: a nukleotid kötő domén (NBD) és a transzmembrán domén (TMD). A funkcionális

fehérje összesen 2-2 NBD-ből és TMD-ből áll, a két NBD együttesen képes az ATP-t megkötni és hidrolizálni (6./A ábra) (63). A nukleotid kötő doménben öt konzervált régió helyezkedik el, a fentebb leírt Walker A (GXXGXGKS/T) és B motívum (hhhhD, h: hidrofób aminosav), az ABC-signature motívum (LSGGQQ/R/KQR), a H- és a Q-hurok (6./B ábra) (64). A transzmembrán régió több hidrofób α -hélixből áll, feladata a szubsztrát felismerése és transzportja a membránon keresztül. Az ABC-transzporterek lehetnek ún. fél-transzporterek, azaz a fehérje két polipeptid láncból áll, homo- (pl. ABCG2) (65) vagy heterodimerként (pl. ABCG5/ABCG8) (66) van jelen a membránban. A fehérjék az emberben kizárólag exporterek, azaz szubsztrátjukat a sejtből kifelé (vagy az ezzel ekvivalens térbe) képesek transzportálni, azonban prokariótákban az importer típusú ABC-transzporterek is előfordulnak (67).



6. ábra: Az ABC transzporterek általános felépítése és az NBD öt konzervált régiója. A. Az ABC transzporterek két fő strukturális egysége a transzmembrán domén (TMD) és a nukleotid kötő domén (NBD). A piros és a kék pöttyök a membrán külső és belső határát jelzik. Az ABCG2 homodimerként működik, a magenta és a lila egységek az ABCG2 két polipeptid láncát jelölik. (*PDB: 5NJ3 alapján*) **B.** Az NBD öt konzervált motívummal rendelkezik, melyek az ATP pozicionálásában és hidrolízisében vesznek részt: Walker A és B motívum, Q-hurok, H-hurok és a Signature motívum. (*Dassa, E. alapján (64), módosítva*)

Az egyes alcsoportokban a domének felépítésben és funkcionálisan is hasonló fehérjék jellemzőek. Ezeket az alcsoportokat, főbb funkciójukat és betegségekben betöltött szerepüket az 1. táblázatban foglaltam össze.

Az ABCA típusú transzporterek rendkívül nagyméretű fehérjék (több mint 2100 aminosav), a lipidek transzportjában és sejten belüli elosztásában vesznek részt. Az ABCA-típusú fehérjékben előforduló mutációk sokféle, a lipid háztartást érintő betegségekhez vezethetnek: Tangier-betegség, öröklődő nagy denzitású lipoprotein (HDL) deficiencia, 1. típusú Stargardt-betegség, öregkori makuladegeneráció (68).

Az ABCB típusú fehérjék csak az emlősökre jellemzőek, négy „teljes-transzporter” és hét fél-transzporter tartozik ebbe a csoportba (69). Kiemelt szerepük van a rákos sejtek multidrog rezisztenciájának kialakításában (ezért szokás MDR fehérjéknek is hívni őket) (70). Az ABCB-típusú fehérjékben bekövetkező mutációk is sokféle betegséggel hoztak összefüggésbe: Bechterew-kór (71–73), lisztérzékenység (71), kolesztázisos májbetegségek (74), PFIC-2 (75).

Az ABCC fehérjék szintén a multidrog rezisztencia kialakulásában vehetnek részt (76–78). Emellett ide tartozik az ABCC7, azaz a CFTR fehérje, melynek mutációi a rendkívül gyakori cisztikus fibrózis (CF) okozói (79). A CFTR fehérje különleges működési mechanizmussal rendelkezik, mely során az ATP-hidrolízis energiáját a nyitott állapot stabilizálására használódik fel (80). A gyakori mutációk és a speciális működési mechanizmus olyan evolúciós termékek, melyek kétféle, ellentétes szelekciós nyomás eredményei: egyrészt a mutációk cisztikus fibrózist okoznak, azonban védettséget is adnak bizonyos betegségekkel szemben, például a kolera és tuberkolózis ellen (81, 82). Az ABCC6-ról nemrég derült ki, hogy nukleotidok és nukleozidok transzportját mediálja (83). Ha a fehérje nem működik (például mutáció következtében), egy korai kalcifikációt okozó betegség alakulhat ki, a pseudoxanthoma elasticum (84). Feltehetően a fehérje az ATP transzportjának irányításában vesz részt a sejteken, mely a sejtől kilépve azonnal hidrolizál és a felszabaduló pirofoszfát csökkenti a kalcifikációt a szövetekben. A pirofoszfátról kiderült, hogy orálisan is alkalmazható, mivel bélen keresztül is felszívódik, mely a betegeknek megoldást jelenthet majd a jövőben (85, 86). Az ABCC fehérjék változatos szubsztrátokkal rendelkeznek, így az általuk kialakított betegségek is sokfélék, Dubin–Johnson szindróma (87), kettes típusú Diabetes (88, 89),

de emellett jellemzőek az örökletes, monogénes betegségek is, mint például a cisztikus fibrózis (ABCC7/CFTR) (79), pseudoxanthoma elasticum (ABCC6) (84, 90), gyermekkori hiperinzulinémiás hipoglikémia (ABCC9/SUR2A) (91), Cantú szindróma (ABCC9/SUR2A) (92).

Az ABCD családba kizárólag fél-transzporterek tartoznak, melyek homo- vagy heterodimer formában képesek transzportálni a szubsztrátjaikat. Összesen négy gén tartozik ebbe a családba, de ez a négy gén csaknem 49 különféle fehérjét kódol, mivel rendkívül összetett alternatív splicing folyamatokkal rendelkeznek (93). A fehérjék a peroxiszóma membránjában helyezkednek el (94, 95). Mutációik olyan betegségek okozói, mint az adrenoleukodisztrófia (ALD) (96, 97) és a Zellweger-szindróma (98).

Az ABCG családba szintén fél-transzporterek tartoznak. Összesen öt génről alternatív splicinggal legalább 18 féle polipeptid lánc keletkezhet, így ezek a fehérjék is rendkívül változatosak (57). Az ABCG2-ön kívül az összes ABCG fehérje a lipid homeosztázist szabályozza (99). Az ABCG1 elsődleges szubsztrátja a koleszterin (100). Az ABCG2 rendkívül széles szubsztrát specifitással rendelkezik. Szteroidokat, klorofill metabolitokat, szerves anionokat, például a húgysavat is képes transzportálni (101). A húgysav a purin nukleotidok lebontási terméke. Mivel az emberben hiányzik a húgysav lebontásában részt vevő urikáz enzim, ezért a szervezet csak transzporterek révén tudja eltávolítani. Amennyiben például az ABCG2 nem megfelelően működik egy mutáció következtében, magas szérum húgysav szint (azaz hiperurikémia) alakulhat ki, mely azután könnyen köszvényes megbetegedéshez vezethet (102–105). Az ABCG2-nek is szerepe van a multidrog rezisztencia kialakításában, bizonyos kemoterápiás kezelések hatására a fehérje szintje rendkívül megemelkedhet (106). Emellett a sztatinok transzportjában is szerepet játszik, a gyógyszerre adott érzékenységi reakció szempontjából is fontos fehérje (107, 108). Az ABCG3 a thymusban és a lépben expresszálódik nagy mennyiségben, valószínűleg limfocitákban különféle peptidok és hidrofób anyagok transzportját végzi (109). Az ABCG5 és ABCG8 fehérje heterodimer formában a koleszterin epébe történő transzportját végzi (66), a mutáció bármely génben zsíryanycsere (sitosterolaemia) betegséghez vezethet (110).

1. táblázat: Az ABC transzporter család tagjai, funkcióik és betegségben betöltött szerepük. Piros színnel kiemeltem a vörösvértesteken is megtalálható membránfehérjéket.

Család	Fehérje	Funkció és betegség
ABCA	ABCA1	foszfolipid és koleszterin transzport, Tangier-betegség
	ABCA2	gyógyszer rezisztencia, A β termelést indukálhat
	ABCA3	foszfatidilkolin és –glicerín trafficking, MDR, újszülött felületaktív anyag hiánybetegség
	ABCA4	N-retinilidén-foszfatidiletanolamin (PE) efflux, különféle makuladegenerációk
	ABCA5	Prosztata intraepitélialis neoplázia (PIN) vizeletdiagnosztikai markere
	ABCA6	MDR
	ABCA7	foszfolipid és koleszterin transzport, fagocitózis
	ABCA8	lipofil drogok transzportja
	ABCA9	monocita differenciációban és a makrofágok lipid háztartásában szerepe lehet
	ABCA10	koleszterin-érzékeny gén
	ABCA12	örökletes keratinizációs rendellenességek
	ABCA13	hasnyálmirigyet érintő örökletes betegségek
ABCB	ABCB1 (P-gp, MDR1)	MDR, kolesztázis
	ABCB2 (TAP1)	peptid transzport, antigén prezentáció, Bechterew-kór
	ABCB3 (TAP2)	peptid transzport, antigén prezentáció, Bechterew-kór
	ABCB4 (MDR2)	foszfatidilkolin (PC) transzport, kolesztázis
	ABCB5	melanogenezis
	ABCB6	mitokondriumban/endoszómában vas transzport
	ABCB7	mitokondriumban Fe/S transzport
	ABCB8	intracelluláris peptid trafficking
	ABCB9	lizoszómális fehérje
	ABCB10	proteolitikus peptidek transzportja
	ABCB11 (BSEP)	epesavak transzportja, PFIC-2
ABCC	ABCC1	gyógyszer rezisztencia
	ABCC2	organikus anionok transzportja, Dubin–Johnson szindróma
	ABCC3	gyógyszer rezisztencia
	ABCC4	xenobiotikumok, nukleozidok transzportja
	ABCC5	xenobiotikumok, nukleozidok transzportja
	ABCC6	anionos ciklopentapeptidek transzportja májban és vesében, nukleotidok és nukleozidok transzportjának mediálása, pseudoxanthoma elasticum
	ABCC7 (CFTR)	klorid-ion csatorna, cisztikus fibrózis
	ABCC8	szulfonil-urea receptor, kettes típusú Diabetes

Család	Fehérje	Funkció és betegség
ABCC	ABCC9	szív K ⁺ (ATP) csatorna SUR2A alegysége, gyermekkori hiperinzulinémiás hipoglikémia, Cantú szindróma
	ABCC10	MDR
	ABCC11	mellrák gyógyszer rezisztenciája
	ABCC12	MDR
	ABCC13	nem ismert funkció
ABCD	ABCD1	nagyon hosszú szénláncú zsírsavak (VLCFA) transzportja
	ABCD2	nagyon hosszú szénláncú zsírsavak (VLCFA) transzportja, X-kapcsolt adrenoleukodisztrófiához (X-ALD) köthető
	ABCD3	zsírsavak és/vagy zsírsav-acetil-koenzim A importja a peroxisómába
	ABCD4	zsírsavak, ALD-hez köthető
ABCG	ABCG1	foszfolipid, koleszterin transzport
	ABCG2	xeno- és endobiotikum transzport, gyógyszer rezisztencia, köszvény
	ABCG4	makrofágokban, szemben, agyban, thymusban és lépben
	ABCG5	szterin transzport, zsírsavcsere betegségek
	ABCG8	szterin transzport, zsírsavcsere betegségek

Az ABC fehérjéket kódoló gének rendkívül hosszúak és sok exonból állnak (11-50 exon) (111). A legtöbb fehérje a bekerülő vagy a sejtben keletkező káros anyagok eltávolításában vesz részt, ezért nem meglepő, hogy szabályozásuk összetett. Alternatív promóter használat és splicing események (93) jellemzőek ezekre a génekre, melyek csak bizonyos szövetekben, szervekben, bizonyos hatásokra (pl. az adott, transzportálandó anyag megjelenésére) következnek be.

Az *ABCG2* génje a 4. kromoszómán helyezkedik el, körülbelül összesen 66 kilobázis hosszú régiót ível át. 16 exonja van, az első exon teljes egészében 5'UTR régiójába esik az mRNS-nek, az általános start helye a második exonban található. A gén transzkripció szinten sokrétűen szabályozott: alternatív promóter használat és alternatív 1. exon (112, 113), alternatív splicing (114), valamint 3'UTR-ben történő mikroRNS (miRNS) szabályozás (115, 116) is előfordulhat bizonyos körülmények között bizonyos sejttípusokban. A promótere TATA-nélküli, CAAT boxot és SP-1 szekvenciákat tartalmaz a CpG szigettől downstream irányban (117). Az egyes exon variánsok közül az E1B és E1C, melyek valószínűleg alternatív splice variánsai egymásnak, az általános, konstitutív variánsai a transzkriptumnak (112). Az E1A csak az össejtekben jellemző variáns, mely erősen indukálható drog szelekcióval, és

valószínűleg az őssejtek védelmében van szerepe (113). Az E1U variánst dendritikus és megakarioblaszt sejtekben azonosították, emellett flavopiridol indukció esetén is jellemző, hatására a fehérje expressziója jelentősen lecsökken (113).

Egy másik érdekes megfigyelés volt, hogy a fehérje rendelkezhet alternatív start hellyel a harmadik exonban (114). Májsejtekben figyelték meg, hogy a V12M aminosavcserével járó SNP hatására lényegesen megnő a kettes exon alternatív splicinggal történő kivágódása az mRNS-ből, mely esetén a harmadik exonban lévő metioninról tud elindulni a transzláció. Ez az alternatív mRNS splice forma (SV1) esetén az expresszió a májban jelentősen lecsökken. A promóterben és az egyes exonban is több olyan SNP-t azonosítottak, mely jelentősen befolyásolja a fehérje szintjét.

A membránfehérjéket célzó proteomikai és antitest alapú vizsgálatok eddig összesen 7 tagját mutatták ki az ABC-típusú transzportereknek a vörösvértestek felszínén: ABCA1, ABCA7, ABCB6, ABCC1, ABCC4, ABCC5, ABCG2 (1. táblázat, vörös színnel jelölve) (10, 118, 119). A vörösvértesteken betöltött szerepük még nem teljesen tisztázott. Az ABCB6 és ABCG2 fehérjék bizonyos mutációi homozigóta formában a fehérjék teljes hiányát okozzák a vörösvértesteken (120, 121). Ezért ezeknél az embereknél termelődik a fehérjék ellen antitest, mely Langereis negatív (122) és Junior negatív (123) vércsoportot eredményez.

2.2.2 SLC-típusú, másodlagosan aktív vagy facilitált diffúzióra képes transzporterek

Számos olyan SLC-típusú, másodlagosan aktív ioncsatorna megtalálható a vörösvértesteken, melyek a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ által kialakított iongradienst kihasználva képes egy másik iont transzportálni (11). A kotranszporterek közül megtalálható egy $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ kotranszporter (*SLC12A2*) és egy $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ kotranszporter (*SLC12A7*). Antiporterok közül a $\text{Na}^+\text{-H}^+$ kicserélő található meg a vörösvértestek membránjában. A $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ kotranszportert a sejtek duzzadása, csökkent intracelluláris Mg^{2+} koncentráció, csökkent pH és tiol-oxidáció aktiválja, szerepe leginkább a vörösvértestek érése és differenciációja során lehet (124).

A vörösvértestek membránfehérjei közül talán a legfontosabb az ún. Band 3 fehérje (*SLC4A1*), mely egy antiporter fehérje, a bikarbonát- és klorid-ionoknak

biztosítja a gyors transzportját (125, 126). Nagyobb anionok (pl. szulfát, foszfát, foszfo-enol-piruvát, és a szuperoxid) is képesek rajtuk keresztül átjutni a membránon, csak sokkal lassabban (127). A bikarbonát a vörösvértestben keletkezik a karbonil-anhidráz enzim működésének termékeként. A folyamat során felszabaduló proton a hemoglobinhoz köt és az oxigén felszabadulását segíti elő a szövetekben (128). Lévén az egyik leggyakoribb glikoprotein a vörösvértest membránjában, a Band 3 fehérje a vörösvértest alakjának kialakításában is részt vesz citoplazmatikus régióján keresztül citoszeletális fehérjékkel kapcsolódva (11, 129).

A vörösvértestek elsődleges energia forrása a glükóz, mely energia befektetés nélkül, a gradiensnek megfelelően facilitált diffúzióval jut be a sejtbe (130). A proteomikai vizsgálok eddig három glükóz transzportert azonosítottak, a GLUT-1, GLUT-3 és a GLUT-4-et (*SLC2A1*, *SLC2A3*, *SLC2A4*, <http://rbcc.hegelab.org>) (118). Emellett megtalálható még az *SLC19A1*, mely vörösvértesteken nem csak folát transzporterként működik, sőt, megnövekedett ion- és cukor-transzport funkció jellemző erre a fehérjére (11).

A glükóz transzporterek mellett számos, a vörösvértest önfenntartásában és fejlődése során fontos SLC típusú transzporter megtalálható még a sejt felszínén, például nukleozid, aminosav, kolin, monokarboxilát transzporterek (11).

2.2.3 Aquaporinok

Az aquaporinok a szelektív csatornák közé tartoznak. A vörösvértestek membránján pórust tudnak formálni, melyen keresztül a víz passzívan áramolhat. Segítségével a vörösvértest gyorsan tud reagálni a hirtelen bekövetkező ozmotikus változásokra (131). Proteomikai vizsgálatok alapján a vörösvértesteken az aquaporin 1 (131) és az aquaporin 3 (132) fehérje található meg.

2.2.4 Ioncsatornák

A vörösvértestek a véráramban igen nagy mechanikai hatásoknak vannak kitéve. A PIEZO1 mechanoszenzitív ioncsatorna megtalálható a felszínükön, mely mechanikai erőbehatásra pórust formál. A póruson keresztül a vörösvértestekbe kationok

beáramlása indul meg, ami a sejtek gyors vízvesztését okozza (133). A fehérje funkciónyerő (gain-of-function) mutánsa xerocitózist (a vörösvértestek dehidrációjával járó betegséget) okoz (134), ezzel alátámasztva a fehérje szerepét a sejtek ozmoregulációjában. A fehérje kondicionális kiütése egerekben a vörösvértestek extrém fragilitását és túlzott vízfelvételét okozza (133).

A legfrissebb eredmények alapján a PIEZO1-nek kiemelt szerepe van hemolitikus anémiában, például a sarlósejtes vérszegénységben is (135). Úgy tűnik, az atipikus hemoglobin (HbS) polimerizációja és deoxigenációs folyamatok miatt a vörösvértestekben a PIEZO1 aktiválódik, mely ezután elősegíti a sejtek vízvesztését, a patológias alak kialakulását. A PIEZO1 funkciónyerő mutánsa (E756del) a természetes populációban is jelen van, és úgy tűnik, hogy bizonyos fokú védelmet nyújt malária fertőzés ellen (136).

A Gárdos csatornát Gárdos György fedezte fel 1958-ban vörösvértesteken (137). Később kiderült, hogy a mások által leírt kalcium indukálta kálium csatorna (KCa3.1, KCNN4) megegyezik a Gárdos csatornával (138). A fehérje a beáramló kalcium hatására aktiválódik, mely a membrán hiperpolarizációjához és a sejtek zsugorodásához vezet a KCl és vízvesztés következtében (139). Ennek a mechanizmusnak, amit Gárdos effektusnak is neveznek, fontos szerepe van a vörösvértestek programozott sejthalálában (eriptózisban) (140). Emellett a mikropillárisokban a vörösvértestet érő nyíróhatások következtében is aktiválódik a fehérje (138). A sarlósejtes vérszegénységre jellemző patológias sejthalak is a fehérje működésének köszönhető (53, 142). A PIEZO1 csatorna aktiválódását követően, a PMCA-típusú kalcium exporterek kismértékű gátlása következik be, így a vörösvértestekben megemelkedik az intracelluláris kalcium szint (143, 144). Emiatt a Gárdos csatorna aktiválódik és jelentős mértékű vízvesztés következik be a sejtekben. Ennek pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert, ugyanis nem az összes vörösvértest reagál ugyanúgy a megemelkedett intracelluláris kalcium szintre, csak egy véletlenszerű hányaduk veszíti el az alakját (145).

Ezek mellett két feszültség-kapuzott ioncsatornát is azonosítottak a vörösvértestek membránjában, a CLIC1-et és a CLIC3-mat (chloride intracellular

channel) (146). Ezeknek a fehérjéknek az aquaporinok szabályozásában lehet szerepük (147).

2.3 Előzetes eredmények: vörösvértest membrán expressziós vizsgálatok

Az MTA TTK Enzimológiai Intézetében működő áramlási citometriás labor Dr. Várady György vezetésével még érkezésem előtt kifejlesztett a laborban egy, a vörösvértesteken jelen lévő membrán fehérjék mennyiségi meghatározására alkalmas antitest alapú módszert. A módszer szabadalom alatt áll (148).

Először a csoportnak össze kellett gyűjtenie, hogy valójában milyen membránfehérjék vannak jelen a vörösvértesteken. A membránfehérjék azonosítása kihívást jelent, mivel a lipid környezet megnehezíti az izolálásukat, sok fehérje „eltemetődve” maradhat. Másik probléma, hogy az egyes fehérjék expressziós szintjeiben igen nagy különbségek vannak, valamint a fehérjének többféle variánsa, poszttranszlációsán módosult változata is jelen lehet a sejtek felszínén. Harmadrészt a vörösvértestek nem rendelkeznek sejtmaggal, így a transzkriptomikai (microarray) vizsgálatok sem jöhettek szóba ez esetben (11, 118). A vércsoport antigének és a vörösvérsejtekre jellemző CD markerek biztosan megtalálhatóak a sejtmembránban (10). Az is a fehérje jelenlétéről árulkodik, ha egy specifikus antitest felismeri a vörösvértesteken. A különféle proteomikai irányú kísérletek (tömegspektrometria, 2D és 1D gél-proteomikai, 2D-nano-HPLC) (11, 118, 149) eredményei ellentmondóak, gyakran fontos vércsoport antigéneket nem találtak meg, viszont olyan fehérjéket azonosítottak, amelyek egyéb vérsejtekre jellemzőek. Ezeknél a kísérleteknél nagyon fontos a megfelelő tisztaságú és minőségű minta előkészítése, mely laborról laborra változik. Dr. Hegedűs Tamás vezetésével tömegspektrometriás és az ismert CD markerek alapján egy vörösvértest proteómot tartalmazó adatbázis készült, amely az esetleges target fehérjéket tartalmazza (<http://rbcc.hegelab.org/>) (118). Az adatbázisban 2638 egyedi fehérje található, melyek közül 846 membrán lokalizált fehérje, közülük 376 fehérje rendelkezik transzmembrán régióval.

A fehérjeszintek mérése vörösvértesteken a csoportunkban beállított antitest alapú módszerrel történik. A mennyiségi meghatározáshoz fontos, hogy az antitesteknél megtaláljuk azt a stabil jelölési tartományt, ahol az általa adott jel a közeli koncentráció tartományokban nem változik (lásd részletesebben Módszerek 9. ábra). Itt meg kell

jegyezni, hogy nagyon sok antitest nem bizonyult megfelelően specifikusnak, vagy nem lehetett megtalálni az előbb említett pontot titrálás során, így itt is sok fehérje mérésének a lehetősége kizáródott. Másrészt voltak olyan antitestek, melyek rendkívül kicsi jelet adtak többféle körülmény és fixálási protokoll mellett is, így azok sem voltak alkalmasak a fehérjeszintbeli különbségek vagy változások kimutatására. A módszerünkkel vizsgált fehérjéket a 2. táblázat mutatja.

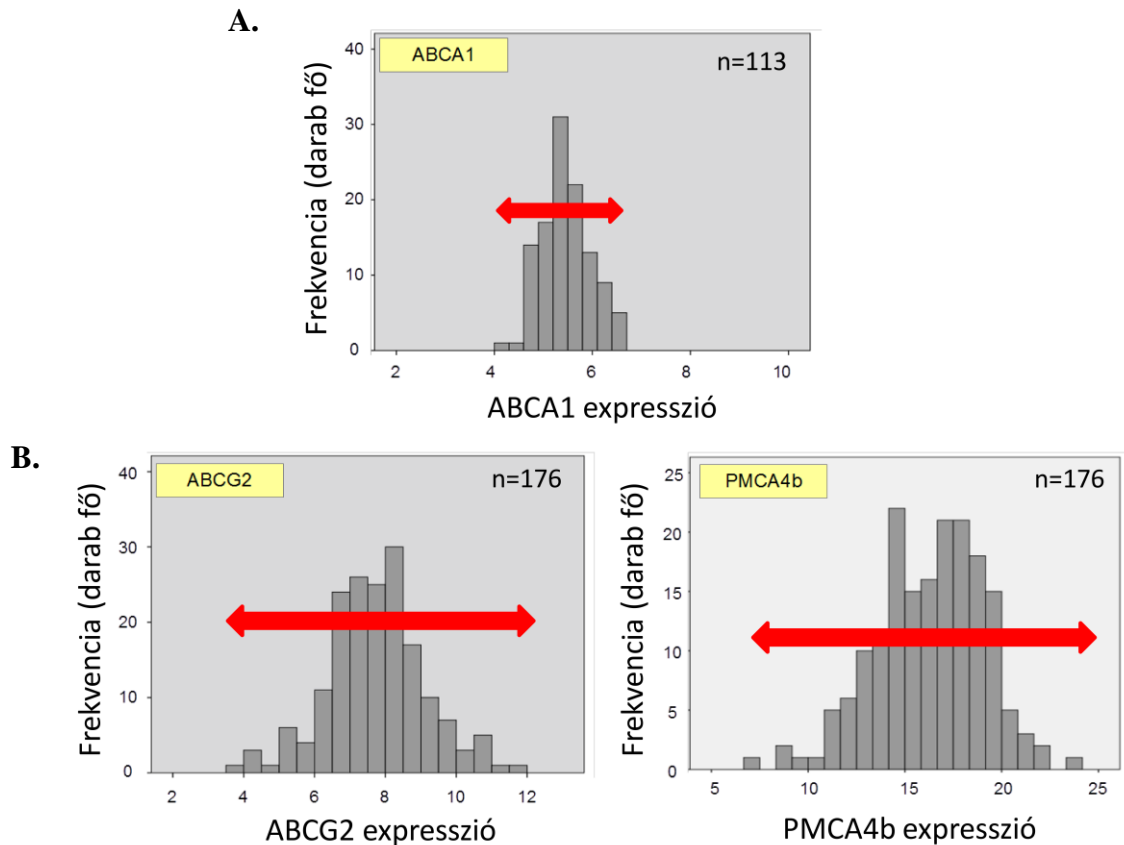
2. táblázat: Az általunk beállított antitest alapú módszerrel vizsgált fehérjék.

Baloldalon azokat a fehérjéket tüntettem fel, amiket a módszerünkkel a vörösvértestek felszínén detektálni tudtunk. Vörös színnel kiemeltem, amely esetekben az antitest megfelelő nagyságú jelet adott és az antitest beállítás is sikeres volt.

Ki tudtuk mutatni	Nem tudtuk kimutatni
GLUT-1 (SLC2A1) GLUT-2 (SLC2A2) GLUT-3 (SLC2A3) GLUT-4 (SLC2A4) ABCA1 ABCB6 ABCC1 ABCC4 ABCG2 INSR (IR) INSR DAF (CD55) SGLT2 (SLC5A2) SLC6A14 SLC7A5 SLC9A1 UT1 (SLC14A1) ThTr1 (SLC19A2) URAT1 (SLC22A12) OAT-5 (SLC22A10) OATP1A2 (SLC21A3) OATP1B1 (SLCO1B1) OATP1B3 (SLCO1B3) OATP2B1 (SLCO2B1) OATP3A1-V1 (SLCO3A1 variáns 1) OATP3A1-V2 (SLCO3A1 variáns 2) OATP4A1 (SLC21A12) NTCF (SLC10A1) PIP4K2A PLSCR1 KCNN4 (Gardos-csatorna) CLIC3 PMCA1 PMCA4b Glikoforin-A	GLUT-9 (SLC2A9) ABCC5 OATP1C1 (SLCO1C1) EAAT2 (SLC1A2) RHAG

Az egészséges kontrollokon mért ABCB6 és ABCG2 szintek között több, az átlagosnál alacsonyabb expresszióval rendelkező önkéntes véradó donor volt megfigyelhető. Sanger-szekvenálás segítségével sikerült azonosítani a csökkent fehérjeszintért felelős genetikai variánsokat. Fontos itt megjegyezni, hogy több olyan variánst azonosítottak, mely homozigóta formában a fehérje teljes hiányát, vagyis Langereis (Lan-) vagy Junior (Jr-) vércsoportot okoz (120, 121). Alzheimeres betegektől származó mintákban azt tapasztaltuk, hogy a GLUT-1 és az ABCG2 szintje a korban és nemben megegyező kontrollokhöz képes megváltozik, mely jelenség mögött valószínűleg a sejtek megváltozott állapota és a fehérje expresszió regulációjának zavara áll (150).

Az egészséges embereken mért expressziós szintek különféle eloszlásokat mutatnak. A szélesebb expressziós eloszlást mutató fehérjék között volt az ABCG2 és a PMCA4b fehérje is (7. ábra/B). Ezzel szemben a példaként felhozott ABCA1 fehérjeszintje stabil, azaz csaknem minden emberben hasonló szintet mértünk, ami azt jelenti, hogy nem jellemzőek a génben az olyan típusú, vörösvértest expressziót befolyásoló gyakori SNP-k, mutációk, mint az ABCG2 vagy az ABCB6 esetén (7. ábra/A). A PMCA4b-t kódoló (*ATP2B4*) gén esetén nem ismertünk mindezidáig a vörösvértest expressziót befolyásoló SNP-t vagy mutációt.



7. ábra: Expressziós szint eloszlások három mért fehérje esetén. A vörösvértesteken antitest alapú módszerünkkel meghatározott fehérjeszintek a különféle fehérjék esetén jelentős eloszlásbeli különbségeket mutattak (piros nyilak). ABCA1 esetén (**A.**) az egyes emberektől származó ghostokon mért szintek viszonylag szűk tartományban mozogtak, míg az ABCG2 és PMCA4b esetén (**B.**) voltak az átlagosnál kisebb vagy nagyobb expresszióval rendelkező emberek is.

2.4 Mitől függhet egy plazmamembrán-fehérje szintje? Transzkripció, transláció, trafficking és lebontó folyamatok szabályozása.

A plazmamembrán fehérjék esetén a fehérje mennyisége a membránban összetett folyamatok végeredményeként alakul ki (8. ábra). Míg egy citoplazmás fehérje esetén a transzkripció, transláció, lebontó és esetleges lokalizációs folyamatok (például membránhoz horgonyzás, nukleáris transzport) határozzák meg az effektív mennyiséget a megfelelő citoplazma térben, addig a membránfehérjék különféle érési folyamatokon

és ellenőrző lépéseken esnek át, míg a membránba jutnak (151, 152). A membránból pedig átmenetileg, szabályozott módon viaszsedődhetnek vagy akár véglegesen lebomolhatnak (153, 154). Csak a plazmamembránba kijutott fehérje képes a feladatát ellátni, ezért ezek az útvonalak kiemelten fontosak az effektív fehérjeszint szabályozásának szempontjából. A sérült fehérjék esetén egy vagy több ilyen útvonal is érintett lehet, ennek feltárása fontos, ha a fehérjét szeretnénk kiségiteni a membránba különféle korrektormolekulák segítségével.

A membránfehérjék keletkezésének első állomása a transzkripció, melynek szabályozása emlőseinkben rendkívül összetett és még nem teljesen feltárt. Sejten belüli és kívüli jelek kombinációja határozza meg, hogy éppen melyik génnek kapcsolódjanak be vagy ki. A legtöbb szabályozási mechanizmus az eukarióta génátírás során az iniciációs szakaszban jellemző, mely során az RNS-polimeráz II (Pol II) bekötődik (155). Közvetlenül az átírás kezdeti helyének szomszédságában található a promóter. A promótertől upstream és downstream irányban is vannak olyan régiók, melyek a Pol II működését befolyásolják. Ezek között lehetnek pozitív és negatív reguláló elemek is, és ezeknek a kombinációja határozza meg az átírt mRNS mennyiségét. A promótertől több – akár 30 kilobázisnyi – távolságban is lehetnek transzkripciós faktor kötőhelyek. Az átírás start helyétől meghatározott távolságban és irányultságban jelenlévő regulátor elemeket enhanszereknek vagy szilenszereknek hívjuk. Jellemzőek a szövet- és jelspecifikus transzkripciós faktor kötő régiók. Az is előfordul, hogy átlapolódnak ezek a kötőhelyek, ezzel lehetővé téve, hogy egy adott jel hatására pozitívan, míg más jel hatására negatívan szabályozódjon az átírás. Ezeknek az ún. cisz-regulátor elemeknek az egyedi kombinációja fogja meghatározni az időbeli és átmeneti transzkripciós programját egy sejtnek.

Az átíródott mRNS érési folyamaton esik át, splicing során az intronok kivágódnak belőle. Az alternatív splicing az a folyamat, mely során a kiindulási, még nem érett mRNS-ről többféle érett mRNS keletkezik (155). Ez forrása lehet a szövetspecifikus fehérje típus megjelenésének, mint például az *ATP2B4* génről kétféle variáns is keletkezhet, melyek aktivitásukban, szabályozásában és szöveti előfordulásukban eltérnek egymástól (19). Az is lehetséges, hogy egy mutáció miatt egy

plusz splice hely keletkezik, vagy éppen elveszik egy, ezért a keletkező fehérje instabil és azonnal lebomlik (121, 156).

A génexpresszió transzlációs szabályozása gyorsabb fehérjeszintbeli válasszal jár a transzkripciós szabályozáshoz viszonyítva. A membránfehérjék transzlációja a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (rER) felszínén történik. A legtöbb szabályozó mechanizmus itt is az iniciációs fázisban jellemző, amikor az AUG start kodont a riboszóma felismeri és az első, metionil-tRNS bekötődik (157). A pre-iniciációs komplex (PIC), mely a kis (40S) riboszómából és a metionil-tRNS-ből áll, bekötődik az mRNS 5' végére és ún. szkennelő mechanizmussal keresi meg az AUG-t. Ebből kifolyólag az mRNS struktúrája befolyásolja a riboszóma bekötődését vagy éppen ezt a szkennelő mechanizmust. Lehetnek az 5'UTR régióban olyan ún. csali AUG-kodonok, melyek szintén lassíthatják az átírást. Emellett az iniciációs faktorok foszforiláltsági állapota is befolyásolja az iniciációt, mely a sejtek aktuális állapotától függ. Például éhezés hatására a faktorok tartósan foszforilálódnak, így az átírás szünetel.

Csaknem a gének fele mikroRNS-ek által szabályozott, körülbelül 1000 miRNS-t kódol a humán genom, ezek közül mindegyik ~10-10 fehérjét képes poszttranszkripciósan szabályozni (158). Az *ABCG2*-ről például nemrégiben derült ki, hogy 3' UTR-éhez több miRNS képes kötődni, és képes a transzlációját befolyásolni (115, 116).

A fehérjeszintézissel párhuzamosan történik a membránfehérjék diszulfid-kötéseinek kialakulása, a megfelelő, membránba ágyazott struktúra kialakulása (159). Amennyiben a fehérje valamilyen mutáció miatt nem képes a membránba beágyazódni, vagy instabil a szerkezete, melyet a chaperonok nem tudnak kijavítani, a proteaszómában azonnali lebontásra kerül (160).

A plazmamembrán-fehérjék legtöbbször jellemzőek a glikozilációs módosítások. A cukorláncok és a fehérje közötti kapcsolat létrehozása szintén az ER-ben történik (152, 161). Amennyiben valamelyik fehérje nem tud megfelelően glikozilálódni, szintén azonnali lebontásra kerülhet. A PMCA fehérjékre nem jellemző a glikoziláció, az *ABCG2* az 596. aszparaginon N-glikozilálódik. Az *ABCG2* a glikoziláció hiányában lebontásra kerül (151, 162).

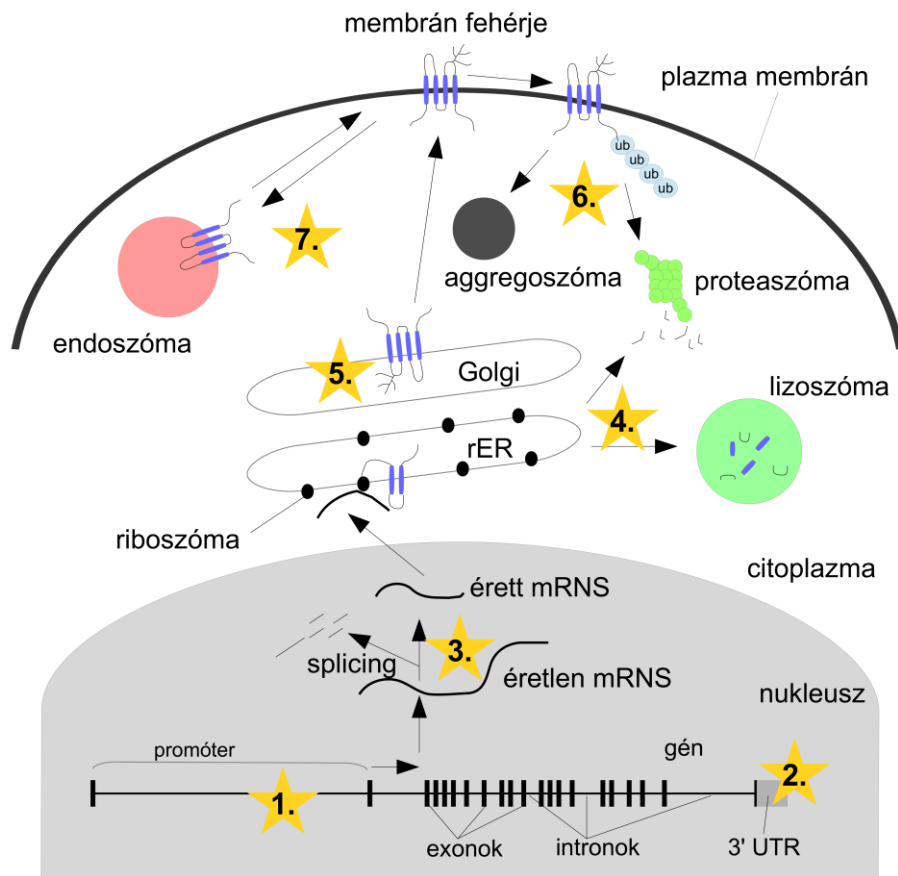
Az elkészült, membránba ágyazott, megfelelő kén-hidakkal és cukorláncsal felszerelt fehérjék a Golgiban folytatják útjukat a membrán felé, ahol további glikozilációs lépéseken eshetnek át, melyek során létrejön az érett membránfehérje. A transz-Golgi hálózatban történik a fehérjék ún. „szortingja”, azaz kiválogatása a megfelelő plazmamembrán irányába (152). A polarizált sejtek működésük során különböző apikális és bazolaterális oldallal rendelkeznek, melyeket tight-junction-ök tesznek átjárhatatlanná. A szorting során a membránfehérjék a megfelelő irányba tartó endoszómákba kerülnek, és többnyire a sejtvázon mozgó motorfehérjékkel haladnak (163). Az apikális irányba történő kiválogatódás a glikozilált fehérjék lektin általi felismerésén alapszik (pl. ABCG2). A bazolaterális irányba tartó membránfehérjékre a C-terminális régióban elhelyezkedő, adaptor fehérjét kötő motívumok a jellemzőek, mint például a PMCA4b esetén a di-leucin motívum (42).

A membránból átmenetileg reciklizáló endoszómákba kerülhetnek bizonyos szignálok hatására a membránfehérjék, ahonnan gyorsan mozgósíthatóak ismét a membránba (153).

A retrográd transzporttal ismét endoszómába került membránfehérjék vagy lizoszómális útvonalon, vagy ubiquitin mediált proteolízissel bomlanak le (151). Amennyiben nagy mennyiségű membránfehérje eltávolítására van szükség, az gyakran aggreszómába kerülhet, ahonnan tovább nem mozgósítható a fehérje. Az ABCG2-re különösen jellemző, hogy a például nem megfelelően feltekeredett variánst hordozó fehérje aggreszómákba kerül (164).

Bizonyos betegségek gyógyítása során szükség lehet olyan kezelésekre, melyek során a hibás, de funkcionális membránfehérjéket megpróbáljuk kisegíteni a membránba. Különféle kémiai chaperonok képesek arra, hogy az endoplazmatikus retikulumban nem megfelelően feltekeredett fehérjét stabilizálják. A hiszton-deacetiláz (HDAC) inhibitorok (HDI-k) a hiszton-deacetilázokat gátolják, melyek nem csupán a hisztonokon működnek, hanem a membránfehérjék transzportjában fontos fehérjéket is képesek deacetilálni (165). Az inhibitorok használatával növelhető a fehérje mennyisége a membránban. Emellett lehetnek olyan szubsztrátok, melyek képesek lehetnek stabilizálni a fehérjét, ezzel növelve átmenetileg a membránban a szintjüket (165). A

lebontó folyamatok gátlása is segíthet a fehérjeszint növelésében. Ezen kívül a kolhicin például a retrográd transzportot gátolja, így a fehérje nem jut aggreszómába.



8. ábra: A membránfehérjék útja a sejten belül és a variánsok által érintett szabályozási lépések.

A fehérje keletkezése során az első lépés a transzkripció, mely során a genomiális DNS szekvencia mRNS-re fordítódik át. A szabályozó régiókban (promóterben, enhancerekben, szilenszerekben) jelenlévő variánsok befolyásolhatják az átírási mértékét (1. csillag). Az 5' vagy 3' UTR-ekben jelenlévő variánsok is befolyásolhatják az átírást, vagy az mRNS életidejét például mikroRNS-eken keresztül (2. csillag). Előfordulnak olyan variánsok, melyek az mRNS splicingot módosítják (3. csillag). A fehérje, ha nem tud megfelelően feltekeredni egy mutáció miatt, lizoszómális vagy proteaszómális lebontásra kerülhet (4. csillag). Előfordulhat, hogy a variáns pont a fehérje glikozilációs helyét érinti, mely szintén a fehérje lebontásához vezethet (5. csillag). A már membránba kijutott fehérje szabályozott módon ubiquitinálódhat és lebomolhat (6. csillag) vagy reciklizáló endoszómába kerülhet átmenetileg (7. csillag).

3. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

1. Az alacsonyabb PMCA4b fehérjeszinttel rendelkező önkéntes donorok genetikai vizsgálatát elvégezni, a csökkent expresszió hátterében meghúzódó genetikai variáns(oka)t azonosítani. Szerettem volna továbbá az azonosított variánsok expresszióra gyakorolt hatásának pontos molekuláris mechanizmusát megérteni.
2. Az alacsonyabb ABCG2 fehérjeszinttel rendelkező önkéntes donorok és köszvényes betegek genetikai vizsgálatát elvégezni, a csökkent expresszió hátterében meghúzódó genetikai variáns(oka)t feltárni. Szerettem volna ebben az esetben is az azonosított variánsok expresszióra gyakorolt hatásának pontos molekuláris mechanizmusát megérteni.

4. MÓDSZEREK

4.1 Membránfehérjék mérése vörösvértestekből képzett *ghost*okon

Véradó donorok

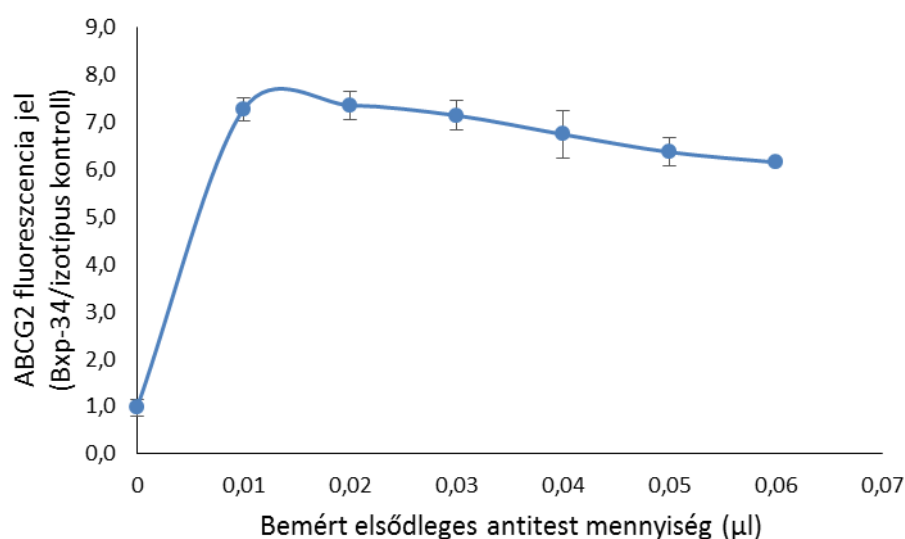
Az egyik csoportunk 155 (PMCA4b) és 127 (ABCG2) intézeti egészséges fiatal véradó önkéntesből állt, tőlük ujjbegyszúrással vettünk vért. Emellett a klinikus partnereinktől (ORFI, Dr. Poór Gyula és Dr. Pálincás Márton) is kaptunk EDTA-antikoagulált vérmintákat, köszvényes betegektől (n=64) és nemben és korban megegyező kontrolloktól (n=37). A vérmintákat azonnal a vérvételt követően elküldték és még aznap vagy másnap feldolgozásra kerültek.

Ghost képzés vörösvértestekből

A vörösvértestekből először membránt képezünk, mely átjárható az intracelluláris epitópot felismerő antitestek számára is. Ezt enyhe fixálással érjük el: 2 ml 37 °C-os PBS-be 50 µl vért veszünk le ujjbegyszúrással, majd ehhez 2 ml 2%-os formaldehid oldatot adunk. 5 percig 37 °C-os vízfürdőben enyhén rázatva inkubáltuk. Ezután 5 percig 1000 g sebességgel fugáltuk. A keletkezett pelletet 4 ml PBS-sel megmossuk, majd ismét fugáljuk 1000 g-vel 5 percig. A fugálás végén fehér pelletet kapunk, mivel az enyhe fixálás során a hemoglobint eltávolítjuk a sejtekből (tehát visszamaradnak a membránok, az ún. *ghost*ok). A felülszót leöntjük és a maradék folyadékot az alján 500 µl-re egészítjük ki. A fixálás végén nagyjából egyforma számú vörösvértesteket kapunk egészséges emberekből származó minták esetén. Anémiás vér esetén előfordult, hogy szükséges volt a sejtszám pontos beállítása. A sejtszámot ekkor áramlási citométerrel határoztuk meg és elvégeztük a minták megfelelő hígítását, hogy egyformák legyenek. Ezután a mintákhoz 4 µl 0,2 mg/ml koncentrációjú búzacsíra agglutinin (wheat germ agglutinin, WGA)-Alexa Fluor 647 festéket tettünk. A *ghost*ok kis méretük és alacsony fénytörésük miatt az áramlási citométeres vizsgálat során az ún. *kosz-zónába* esnek. A WGA nem specifikusan képes a cukorláncokhoz kötni, ezáltal megjelöli a *ghost*okat és a sejteket egyaránt a mintában, így elkülöníthetők az áramlási citométeres mérés során a *kosz-zónától*.

Antitest jelölés

A ghostok elsődleges antitest jelölését összesen 5 µl/lyuk-ban végezzük, mikroplate-ben. 2,5 µl végtérfogatba összesen PMCA4b jelölés során 0,01 µl JA3 antitestet teszünk (Merck Millipore) és ABCG2 jelölés során 0,02 µl BXP-34 antitestet (Abcam). Az antitest hígítást 0,5 m/v%-os BSA/PBS-ben végezzük. Az antitestekből mindig több adagot rendeltünk és *pooloztuk* őket (azaz összekevertük), hogy a mintasor mérése során a felhasználandó mennyiség ne változzon. Ezután koncentráció sort vettünk fel több embertől származó ghostokon, és azt a mennyiséget használtuk, mely esetén az antitest már telítést mutatott (példa: 9. ábra). Ez azt jelenti, hogy ezt a mennyiséget használva kis bemérési hibák és kisebb ghost mennyiség változás hatására a mért jelünk nem változik. A fehérje elleni antitestek mellett az elsődleges antitest izotípusának megfelelő kontrollt is összemértünk. A 2,5 µl hígított antitestünkhöz 2,5 µl ghostot adtuk. A plate-et 37 °C-on 40 percen át rázatva inkubáljuk.



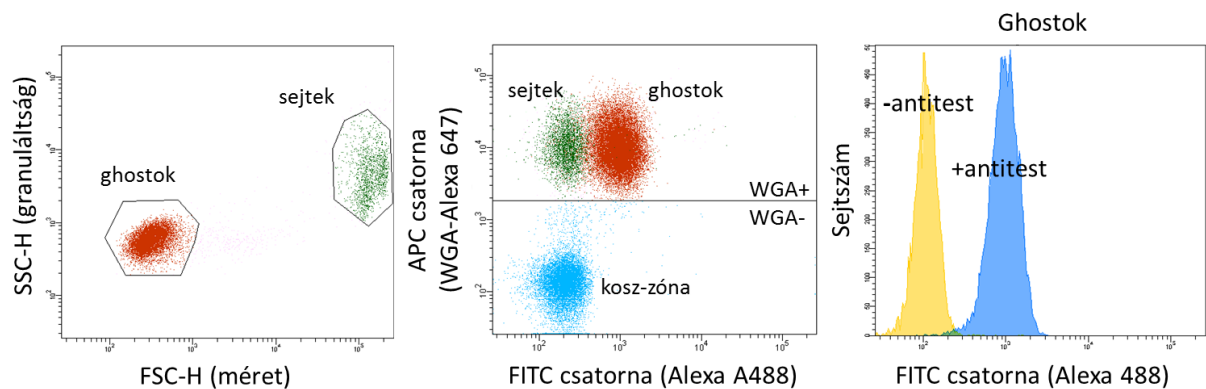
9. ábra: Antitest titrálási példa. A Bxp-34 antitestből többféle mennyiséget bemértünk. 0,02 µl környékén eléggé stabil jelet kaptunk, így ezt a mennyiséget használtuk a későbbiekben.

Kecske-anti-egér Alexa-488 jelölt általános (H+L) másodlagos antitestet használunk, melynek mennyiségét szintén előzetes titrálás során határoztuk meg. Összesen 0,05 µl másodlagos antitestet hígítottunk 4,95 µl 0,5 m/v%-os BSA/PBS-hez

lyukanként. Az elsődleges antitesttel jelölt mintákat 20 µl PBS-sel hígítottuk, majd egy másik lyukba vagy plate-re áteszünk belőle 5 µl-ert plusz hozzá 5 µl másodlagos antitestet. A plate-et 37 °C-on 30 percen át rázatva inkubáljuk. A másodlagos jelölés végén a mintákhoz 90 µl PBS-t teszünk és ebből a hígított mintából 40 µl-ert 260 µl-nyi PBS-be áteszünk, melyből majd a mérés történik. Tehát a jelölés során fugálás helyett sorozatos hígítást alkalmaztunk a nem specifikusan kötődött antitestek eltávolításának céljából. Erre azért volt szükség, mivel a ghostok fajsúlya közel van a vízéhez, ezért a fugálások során sok ghostot elveszítettünk, így nem volt megbízható a módszer. A hígítások végén körülbelül 100.000 jelölt ghostnak kell maradnia lyukanként.

Áramlási citometriás mérés

A mérést HTS-sel (plate olvasóval) felszerelt Canto II (BD) áramlási citométeren végezzük. A kapuzás során először az FSC-SSC csatornában a ghostokat (melyek a kosz-zónába esnek) elkülönítjük az épen maradt (nem fixálódott) sejtektől. Ezután az Alexa Fluor-647 jele alapján (APC csatorna) a ghostokat elkülönítjük a kosz-zónától. Az antitest jelünket a FITC csatornán (Alexa Fluor-488) határozzuk meg ezeken a ghostokon (10. ábra).



10. ábra: A vörösvértest ghostok kapuzása áramlási citométeren.

Relatív expresszió számítása

A relatív expressziót úgy kaptuk meg, hogy az elsődleges antitestet tartalmazó lyukak fluoreszcenciájának mediánját elosztottuk az azonos mintán izotípus antitesttel mért medián értékekkel.

4.2 DNS izolálás vérből, szekvenálás és genotipizálás

DNS izolálás és a Sanger-szekvenálás

A genomiális DNS-t 300 µl EDTA-kezelt vagy friss, ujjbegyszúrásból származó vérből Puregene Blood Kittel (Qiagen, Biomarker Kft.) nyertem ki. Az *ABCG2* kódoló régióinak szekvenálása során azokat a primereket használtam, amiket korábban *Zelinszki és munkatársai* is (166). Az *ATP2B4* kódoló régióit és exon-intron határait is látó szekvenáló primereket én terveztem meg (3. táblázat) az NCBI honlapján megtalálható szekvencia alapján Primer Blast (NCBI) segítségével. A genomiális DNS-ből PCR-rel szaporítottam fel az egyes exonok DNS-ét, majd 1 m/v%-os agaróz gélen megfuttattam és kiizoláltam Wizard SV Gel and PCR Clean-Up kittel (Promega, Bioscience Kft.). Az így kinyert és felszaporított exonok szekvenciáinak meghatározását a megfelelő primerekkel a Microsynth céggel végeztettem el.

3. táblázat: A PMCA4b fehérjét kódoló *ATP2B4* gén exonjaira tervezett primerek.

exon	forward primer (5'-3')		reverz primer (5'-3')	
exon-01	<i>2B4prom1F</i>	CTGGTGGGTACAGGGACAAG	<i>2B4prom1R</i>	AATCGGGGAGTTTTAGAAGCCA
exon+01	<i>2B45UTR2F</i>	GTACCTCTTGCCCTTGCAGAT	<i>2B45UTR2R</i>	CTAGCCACCTTCCTCCAACCTC
exon+02	<i>2B4E02F</i>	CCTGGGCAGATTAGGATGGT	<i>2B4E02R</i>	CTTTGGAAAGCCCACTCTGGA
exon+03	<i>2B4E03F</i>	TCTTGGGGTGATTGTGGAAGC	<i>2B4E03R</i>	TCCCTTAAATGGGGGTGGTG
exon+04	<i>2B4E04-5F</i>	CCATGGGAACAGCCATGAGAT	<i>2B4E04-5R</i>	CCTTGTGTTCATGGGGATG
exon+05				
exon+06	<i>2B4E06F</i>	CCCTTCCCTGCAACCCAAA	<i>2B4E06R</i>	AAGATGGCCTGGAAAGGTCTG
exon+07	<i>2B4E07F</i>	GGGTTGGAAGTGGTCGGAAC	<i>2B4E07R</i>	GCTTCTTTCTGCCAGTCTCG
exon+08	<i>2B4E08F</i>	ACGAAACCACTGTCTGTTCCC	<i>2B4E08R</i>	CAGGGACTTCTGCTCTTGTGA
exon+09	<i>2B4E09F</i>	GTGGAGAGATGTTGGCTAGGA	<i>2B4E09R</i>	TGTGGGATGGCAATTTAGGCA
exon+10	<i>2B4E10F</i>	CCCTAAGTTCTCTGCCTTGTC	<i>2B4E10R</i>	TCACATGGGTTCAAGTGTGGG
exon+11	<i>2B4E11F</i>	CCTTGGAAAGAGGGACTCAGC	<i>2B4E11R</i>	TGAAGCAGGAAGCACAGAAAC
exon+12	<i>2B4E12F</i>	TGCATGGCACCCTTCTAGG	<i>2B4E12R</i>	GCTAGAACCCGCCTTTTCCT
exon+13	<i>2B4E13F</i>	GTGGTGTACCAATCTCCAG	<i>2B4E13R</i>	AGGAGAGTGGCTTTGGCTG
exon+14	<i>2B4E14F</i>	GGGGGAGACCAGAAAAGCTC	<i>2B4E14R</i>	GGGCTATGCAGGTGTAGCAA
exon+15	<i>2B4E15F</i>	AATGGAGCCTGGGCTTTATCC	<i>2B4E15R</i>	CACTCCATGTTCCCTTAGCCCC
exon+16	<i>2B4E16F</i>	AAAGGTGGGCTGGTTTCAGAG	<i>2B4E16R</i>	ACTTGCTCTCACGCTACCTTC
exon+17	<i>2B4E17F</i>	ATGGACACCAGCCATAAGCA	<i>2B4E17R</i>	ACAGCTCCAGTCCCCGTAAT
exon+18	<i>2B4E18F</i>	GAGTGGGATGATGTGGCTTT	<i>2B4E18R</i>	CTTGAAAACCTTGAGTGGGGGTG
exon+19	<i>2B4E19F</i>	CTGACAGCTCTTCTCACGCT	<i>2B4E19R</i>	GAAGAGATGCTGGCCGACAA
exon+20	<i>2B4E20F</i>	CCACCCCACTGCTTGAAAGT	<i>2B4E20R</i>	CCGCTACAAACCCCAAGTCA

TaqMan alapú genotipizálás

Az azonosított mutációkat és SNP-eket TaqMan alapú qPCR módszerrel határoztam meg nagyobb mintaszámon. A genotipizálást StepOnePlus készüléken végeztem el (Applied Biosystems) előre gyártott vagy egyedileg készített próbakkal (4. táblázat) és genotipizáló master mix-szel (Thermo Fisher Scientific). A próba specificitását szekvenálással ellenőriztem minden esetben.

4. táblázat: A genotipizálandó SNP-k és a beállított próbák típusai.

gén	aminosav/nukleotid csere	SNP/mutáció rs kódja	próba azonosító száma
ABCG2	Q141K/c.421C>A	rs2231142	C__15854163_70
ABCG2	M71V/c.211A>G	rs148475733	C__170723361_10
ABCG2	R236X/c.706C>T	rs140207606	C__170199283_10
ABCG2	R383C/c.1147C>T	rs560659849	egyedileg készített
ATP2B4	c.-407C>T (Haplotípus 1)	rs1541252	C__360682_10
ATP2B4	c.*86C>T (Haplotípus 2)	rs955866	C__385099_10
ATP2B4	c.1557+18G>A (Haplotípus 3)	rs3753036	C__25591986_10
ATP2B4	c.-494A>G (promóter)	rs4600103	C__31796404_10

4.3 DNS konstrukciók létrehozása

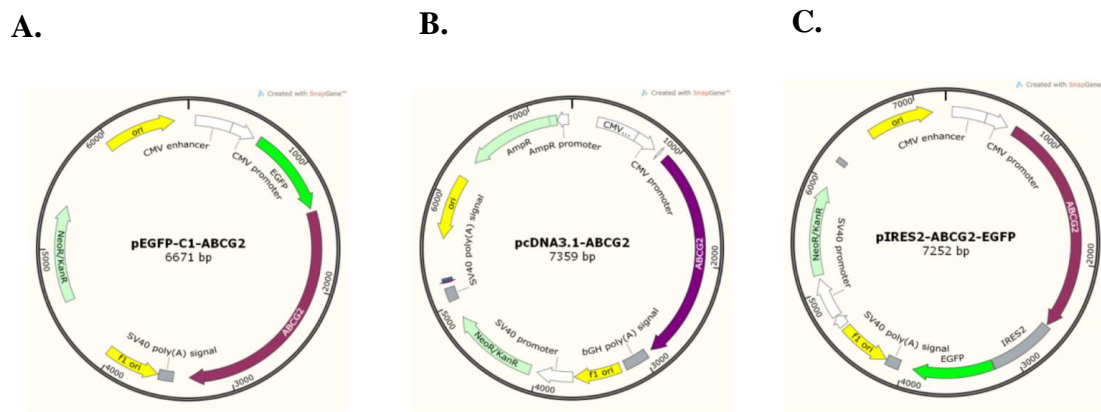
Az ABCG2 expresszió és transzport emlős sejtekben történő méréséhez kétféle konstrukciót hoztam létre, illetve már rendelkezésünkre állt egy címke nélküli vektorkonstrukció (11. ábra). A direkt ABCG2 expressziós és lokalizációs mérésekhez egy GFP-fúziós ABCG2 vektort készítettem. A módosítatlan ABCG2 expresszió és transzfekciós hatékonyság egyidejű meghatározásához egy belső riboszóma belépési hely szekvenciát (internal ribosomal entry site, IRES) tartalmazó vektort készítettem (az alap pIRES-GFP vektort Dr. Nyitray Lászlótól kaptam), melyről függetlenül expresszálódik az ABCG2 és a GFP. A helyspecifikus M71V mutációt QuickChange protokoll szerint végeztem el az alábbi primerekkel az ABCG2 vad típusú szekvenciát tartalmazó pcDNA3.1 vektoron (Dr. Laczka Csillától kaptam, a módosított nukleotid triplet: ATG>GTG, vastaggal jelölve):

forward: 5'-CGAATATCAATGGGATCGTGAAACCTGGTCTCAAC-3'

reverse: 5'-GTTGAGACCAGGTTTCACGATCCCATTGATATTCG-3'

A megfelelő pEGFP-C1-ABCG2-WT vektorba félkazetta cserével, NotI/PstI hasítóhelyekkel tettem be az M71V-t hordozó *ABCG2* szekvenciáját. A pEGFP-C1-ABCG2-WT, K86M, Q141K vektorokat szintén Dr. Laczka Csillától kaptam.

A pIRES2-GFP vektorba XhoI/BamHI hasítóhelyekkel juttattam be az *ABCG2*-WT, M71V, K86M, Q141K szekvenciáit a megfelelő pcDNA3.1 vektorokból.



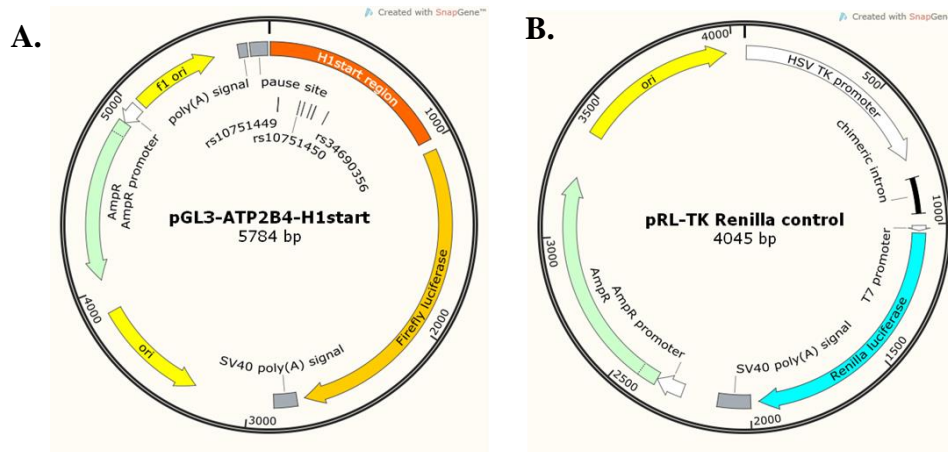
11. ábra: A használt ABCG2-öt tartalmazó konstrukciók. A. GFP-címkével kovalensen kötött ABCG2. **B.** Címke nélküli ABCG2. **C.** IRES szekvenciával elválasztott ABCG2 és GFP. (SnapGene3.1)

Az *ATP2B4* enhanszer vizsgálathoz pGL3-basic vektorba (Dr. Szakács Gergelytől kaptam) az *ATP2B4* gén 1. intronjában elhelyezkedő haplotípus részletet helyeztem be. A vad típusú és haplotípus hordozó szekvenciákat az K030-as vad típusú és a K110-es homozigóta haplotípus hordozó kontrollokból nyertem ki PCR segítségével, az alábbi primerekkel (a hasítóhely vastaggal jelölve):

forward (KpnI): CATGTAG**GTACCG**CCCCACTCTGAAACTGAGA

reverse (XhoI): AGCTCA**CTCGAG**GAAGACTCAAGAGAGGCCCGTTC

A PCR terméket gélből izoláltam, majd a vektort és a terméket is KpnI/XhoI enzimekkel hasítottam, majd összeillesztettem ligáz enzim segítségével. A kontroll pRL-TK plazmidot is Dr. Szakács Gergelytől kaptam (12. ábra).



12. ábra: A duál-luciferáz esszéhez használt plazmidok. **A.** A pGL3 plazmid tartalmazza a haplotípus upstream irányban elhelyezkedő szekvenciáját vad típusú vagy haplotípust tartalmazó formában (narancssárga), majd utána egy szentjánosbogár luciferázt (narancssárga). **B.** A kontroll plazmid a HSV timidin kináz promóterét (fehér) tartalmazza, utána pedig egy Renilla luciferázt (kék). (SnapGene3.1)

4.4 Emlős sejtvonalak fenntartása, transzfekciója, jelölése és mérése áramlási citométeren

Emlős sejtvonalak fenntartása:

A HEK293 és HeLa sejteket 10% hőinaktivált FBS-t és 1% Penicillin-Streptomycint tartalmazó DMEM/GlutaMAX médiumban (Gibco), a K562 sejteket pedig IMDM (Gibco) médiumban növesztettem 5% CO₂ termosztátban 37 °C-on. A letapadó sejtek passzálása során tripszinnel (TripLE, Gibco) szüntettem meg a kapcsolatot a sejtek és a flaska között, majd 1:10 hígítottam őket.

Transzfekció és kezelések:

Az emlős sejtek transzfekciója liposzómás módszerrel történt Lipofectamine 2000 reagenssel (Invitrogen) a gyártó előírása szerint Opti-MEM médiumban (Gibco). A sejteket 24 órával a transzfekció után kezeltem különféle anyagokkal: 1 mM 4-PBA-val (Dr. Váradi Andrásról kaptuk), 1 μ M kolhicinnel (Sigma-Aldrich) további 24 órán át a mérés előtt.

5D3 jelölés és mérés áramlási citométeren:

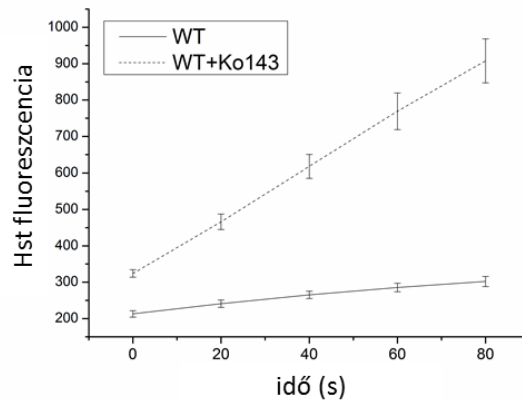
A sejtfelszíni ABCG2 expressziót külső epitópot felismerő antitesttel (5D3, Bryan Sorrentino-tól kaptam az antitestet) mértem meg élő sejteken. A HEK293 és HeLa sejteket 12-well plate-en transzfektáltam a fentebbi módszerrel, majd 48 óra elteltével sejteket megmostam PBS-sel és feltripszineztem őket, majd 5 perc 1000g fugálás után 125 µl PBS-ben visszavettem őket. 5 µg/ml végkoncentrációban 5D3 antitesttel jelöltem őket, mely mellé 1 µM Ko143 ABCG2 inhibítort (Sigma-Aldrich) tettem az optimális jelölés érdekében, mivel ez az antitest konformáció érzékeny (167). Párhuzamosan IgG2b izotípus kontrollal (Thermo Fisher Scientific) is jelöltem a sejteket. 40 percig enyhén rázatva inkubáltam őket 37 °C-on. Ezután 4-4 ml PBS-sel megmostam a mintákat. Alexa Fluor-647 IgG2b (Thermo Fisher Scientific) másodlagos antitestet használtam a fluoreszcens jelölés céljából 0,02 mg/ml végkoncentrációban. Élő-halott markernek propídium-jodidot (Sigma-Aldrich) adtam a sejtekhez a mérés előtt 1,6 µg/ml végkoncentrációban.

A mérést FACS Canto II (BD) áramlási citométeren végeztem. Először az FSC-SSC csatornában kapuztam méret és granuláltság alapján az összes sejtet. A propídium-jodid jele alapján elkülönítettem az élőket a halott sejtektől (PE csatorna). Amennyiben pIRES-típusú vektort használtam, a GFP jele átszólt ebbe a csatornába, de így is el tudtam különíteni az élő sejteket kompenzáció nélkül a FITC (GFP) és PE (propídium-jodid) csatornák alapján. Ezután, amennyiben pIRES vektort használtam, a GFP pozitív (FITC csatorna) sejteket kikapuztam és azokon határoztam meg az 5D3 jelet (APC csatorna).

ABCG2 Hoechst akkumulációs mérés:

Az ABCG2 funkciójának meghatározásához Hoechst 33342 (továbbiakban Hst, Thermo Fisher Scientific) festéket használtam, mely szubsztrátja az ABCG2-nek (168, 169). A HEK293 sejteket pIRES-típusú vad és mutáns verziójú ABCG2-t tartalmazó vektorokkal tranziensen transzfektáltam. 48 óra transzfekció után a fentebb leírtak szerint PBS-be felvettem a HEK293 sejteket. A transzportmérés előtt 5 percig 37 °C-on inkubáltam a sejteket 2 µM Ko143 inhibítorral vagy a nélkül. A mérés 1 µM Hst hozzáadásával indult. 80 másodpercig – mivel ez volt a szubsztrát felvételének lineáris

fázisa - folyamatos mintavételezéssel követtem nyomon a Hst jelét (Pacific Blue csatorna) FACS Canto II (BD) áramlási citométeren a GFP-pozitív (azaz transzfektálódott) sejteken. A kiértékelés során 20 másodperces intervallumok átlagos fluoreszcenciájára kezdeti meredekséget határoztam meg egyenes illesztésével (13. ábra).



13. ábra: A Hoechst 33342 transzport során illesztett egyenesek. A HEK293 sejteket pIRES típusú plazmiddal transzfektáltuk és 48 óra eltétével Hst hozzáadása után mértük a festék felvételét a sejtekbe áramlási citométerrel. A kezdeti meredekséget a lineáris fázisban határoztuk meg (80 másodperc). Az ábra a vad típusú fehérje esetén mért fluoreszcenciát ábrázolja a kezdeti lineáris fázisban. (OriginPro 8)

Duál-luciferáz esszé

Az *ATP2B4* enhanszer vizsgálathoz duál-luciferáz (Promega) vizsgálatokat végeztem a gyártó leírása szerint: A sejteket 24 órával a transzfekció után lizáltam, majd a sejt-lizátumokon először a szentjánosbogár majd a Renilla luciferáz lumineszcenciáját mértem le Victor X3 plate olvasó fluoriméter (PerkinElmer) segítségével 96-lyukú fehér plate-en. Az expresszió mértékét a minta/kontroll lumineszcencia alapján kapom meg.

4.5 Vörösvértest membránpreparátum készítése és Western-blot

Vörösvértest membránpreparátum készítése Wolf-Schatzman módszerrel (45, 46):

Donoronként 4 ml vérből indultam ki a vörösvértestek membránpreparálása során. 400 g-n 5 percig fugáltam 4 °C-on a vérmintákat, ezután a szérumot és a fehérvérsejteket („buffy coat”) eltávolítottam, a maradék mintát háromszor megmostam 2x mennyiségű nátriumos mosóoldattal (0,16 M NaCl, 10 mM pH=7,4 Tris-HCl), minden mosás után 400 g-n 5 percig fugáltam a vörösvérsejteket 4 °C-on és a felülúszót és a fehérvérsejteket eltávolítottam. Ezután 1:10 arányban adtam a vörösvértestekhez Wolf-Schatzman hemolizáló oldatot (20 mM pH7,4 Tris-HCl, 10 mM KCl, 20 mM szacharóz). A mintát 10 percig intenzíven kevertem, amíg kitisztult, ezután proteáz gátló tablettát adtam hozzá (Roche). Beckman L7-55 UC fugával (70.1Ti rotor) 35.000 rpm-en (~100.000 g) 60 percig 4 °C-on fugáltam. A fugálás után a felső fázist óvatosan eltávolítottam. A membránpelletet Wolf-Schatzman mosóval mostam, majd ismét a fent leírt módon fugáltam, addig, amíg a pellet ki nem fehéredett (háromszori mosás elég volt). Végül a pelletet felvettem Wolf-Schatzman mosóban (kiindulási mintától függően 500-1000 µl-ben) és egy boroszilikát üveg homogenizáló csőbe töltöttem. A mintákat teflon (PTFE) fejjel ellátott homogenizáló rúddal homogenizáltam („pottereztem”) minimum negyed órán át. A membránpreparátumot -80 °C-on tároltam. A fehérjekoncentrációt Lowry-Folin módszerrel határoztam meg.

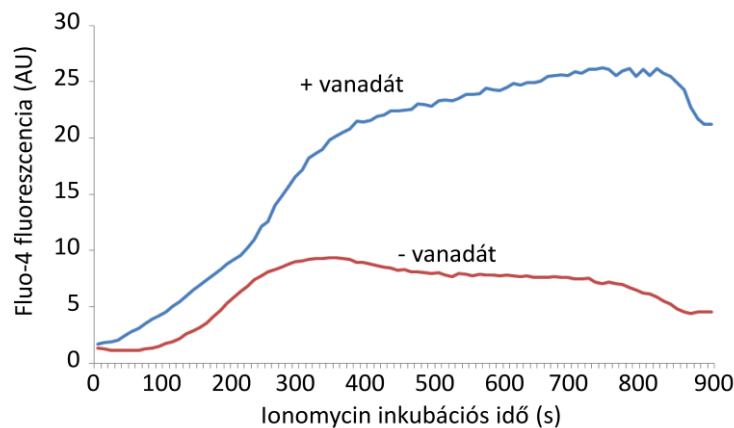
Western-blot:

A vörösvértest membránfehérje preparátumokból egyforma mennyiséget (Lowry-Folin módszer alapján, 20-20 µg-ot) vittünk fel 7,5%-os akrilamid gélre. Elektroforézis után PVDF membránra átblottoltuk a fehérjéket és immunfestettük a membránt. Az alábbi elsődleges antitesteket és hígításokat használtuk a festés során: anti-pan PMCA (5F10, 1:100), anti-PMCA4 (JA9, 1:250), anti-PMCA4b (JA3, 1:1500), anti-PMCA1 (NR1, 1:500). A membránt az elsődleges antitestben 4 °C-on egész este inkubáltuk, majd másnap mosások után tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-egér antitesttel jelöltük tovább. Pierce ECL Western Blot szubsztrát segítségével luminográfiás eljárást használtunk a fehérjék megjelenítésére, majd röntgenfilmen rögzítettük a jeleket. A

röntgenfilmek kiértékelését ImageJ szoftverrel denzitometriás módszert alkalmazva hajtottuk végre.

4.6 Kalcium transzport mérések vörösvértesteken

A vörösvértestek kalcium transzport aktivitását Fluo-4 fluoreszcencia alapú kalcium influx mérésekkel határoztam meg áramlási citométeren. A mérésbeállítás során *de Jong és munkatársai* (170) alapján indultam el, de a módszerüket több ponton módosítottam. 2 ml HepesBS-be (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH7,4) 2,5 µl vért tettem ujjbegyszúrás követően. 5 perc, 1000g-n, 4 °C-on történő fugalás után a felülúszót leöntöttem és a sejteket 2 ml Buffer B-ben (10 mM HEPES, 70 mM NaCl, 80 mM KCl, 10 mM inozin, 5 mM piruvát, 0,15 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, pH7,4) vettem vissza. Ezután 1 µM végkoncentrációban Fluo-4-AM-et tettem a sejtekhez és 37 °C-on 1 órán át inkubáltam enyhén rázatva őket, hogy a sejtekbe bejusson a Fluo-4 és az észteráz hasítás megtörténhessen. 50 µl vörösvértesthez 500 µl 37 °C-os HBSF-KCM-et (10 mM HEPES, 70 mM NaCl, 80 mM KCl, 5 mM inozin, 5 mM glükóz, 0,15 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,15 mM CaCl₂) tettem. A mérést ionomycin ionofórral indítottam (0,8 µM végkoncentrációban használtam). Amint az ionomycint a sejtekhez tettem, azonnal az áramlási citométerbe (Canto II BD) helyeztem a csövet és elindítottam a mérést, amely 15 percen át, folyamatos mintavételezés mellett zajlott. A PMCA gátlás vizsgálatoknál vanadátot használtam 1 mM végkoncentrációban. A kiértékelés során meghatároztam a görbe alatti területet, miután normalizáltam a fluoreszcencia értékeket a t_0 -ban mért értékkel (OriginPro 8 szoftverrel). Egy példamérést a 14. ábrán mutatok be.



14. ábra: Példa Fluo-4 alapú kalcium transzport mérésre a K030, átlagos expressziójú önkéntes véradó kontroll vörösvértestjein. A Fluo-4 fluoreszcenciáját időben folyamatosan követve mértem vanadát ATPáz gátlószerral és anélkül.

4.7 Statisztika

Az összes statisztikai analízist Statistica 6.4 (Dell) szoftverrel végeztem. A genotípus vörösvértest expresszió összevetéséhez Kruskal-Wallis tesztet használtam, a köszvényes és kontroll csoport összevetését Mann-Whitney tesztel végeztem el. A plazmid expressziós és transzport méréseknél t-tesztet alkalmaztam. A Fluo-4 alapú kalcium transzport mérések során a görbe alatti területet (AUC, area under the curve) OriginPro 8 szoftverrel számítottam ki a normalizált fluoreszcencia értékek alapján.

5. EREDMÉNYEK:

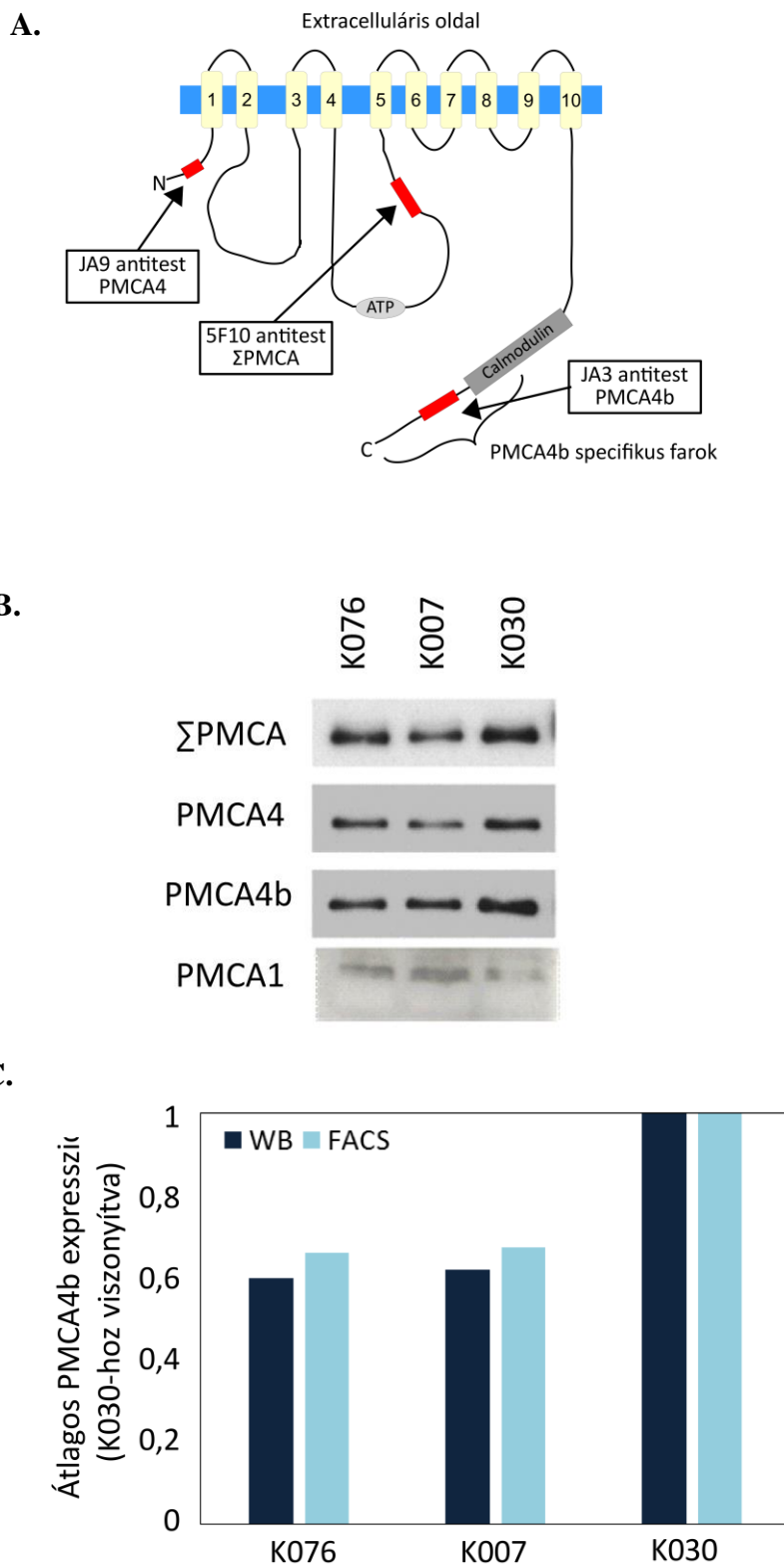
5.1 Az alacsonyabb PMCA4b fehérjeszintet okozó genetikai variánsok nyomában

5.1.1 PMCA4b fehérjeszintek meghatározása áramlási citométerrel a vörösvértesteken

A PMCA4b fehérjét specifikusan célzó antitest (JA3) segítségével megmértük 155 egészséges fiatal PMCA4b fehérjeszintjeit (lásd Módszerek). A mérések során több embert is találtunk, akik alacsonyabb szintet mutattak (7. ábra/B. jobb panel).

5.1.2 Western-blot analízis vörösvértest membránpreparátumokon

Mivel a PMCA fehérjék mRNS-e nagyfokú alternatív splicingon esik át érése során, ezért kíváncsiak voltuk rá, hogy esetleg nem a splicing sérül ebben az esetben és a PMCA4b helyett a PMCA4a variáns van jelen a vörösvértesteken. Azt feltételeztük, hogy a PMCA fehérjék esszenciálisak a sejtek számára (főként a PMCA4b a vörösvértest számára), ezért a továbbiakban arra is kerestük a választ, hogy nem történik-e esetleg kompenzáció a PMCA1 által ezeken a vörösvértesteken. Ehhez két alacsonyabb expressziójú és egy normál expressziójú ember vörösvértestjeiből membránt preparáltam és Western-blot analízist végeztünk (Dr. Enyedi Ágnes és csoportja segítségével). A fehérje a megfelelő mérettartományban volt (kb. 130 kDa), tehát a mérete nem változott meg a potenciális genetikai variáns hatására (nincs benne egyéb alternatív splicingot érintő mutáció, frameshift, stop, delécio, inszercio). Rendelkezésünkre állt többféle antitest, melyek különféle izoformákat és variánsokat ismernek fel (15. ábra/A.) (51), alátámasztottuk, hogy nincs érdemleges kompenzáció más izoforma által és splice variáns váltás sem figyelhető meg (15. ábra/B.). A Western-bloton mért expressziós értékek korreláltak az általunk FACS-on mért eredményekkel (15. ábra/C.).

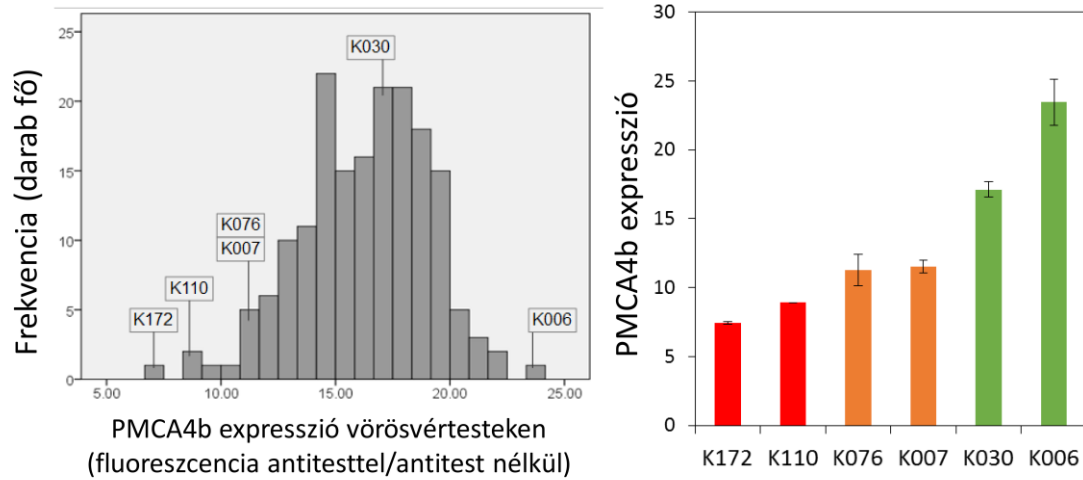


15. ábra: Vörösvértest membránpreparátumok Western-blot analízise. **A.** A Western-blot során háromféle, különböző izoformákat és variánsokat felismerő antitestet használtunk. **B.** A PMCA4b fehérje ép, mérete változatlan és nincs érdemleges kompenzáció más PMCA izoforma vagy variáns által. **C.** A Western-blot (WB) eredményeink korreláltak az áramlási citométeres (FACS) analízissel.

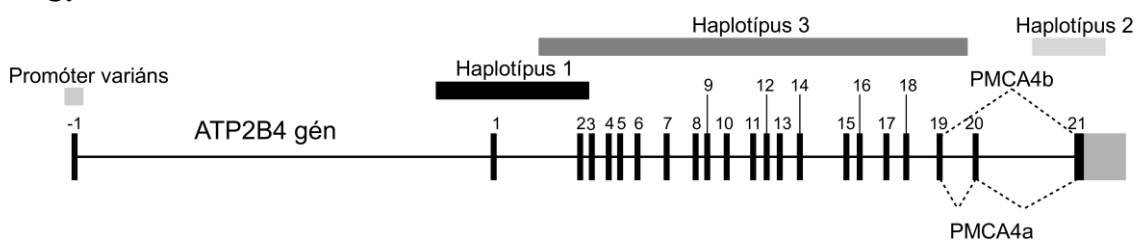
5.1.3 Az *ATP2B4* gén exon-szekvenálása és qPCR vizsgálata

Az eltéréseket a vörösvértest membránfehérje szintekben okozhatják genetikai variánsok (SNP-k, mutációk) vagy a fehérjét érintő regulációs módosulások (lásd Bevezetés 1.4). Hogy feltárjam a PMCA4 fehérje génjében, az *ATP2B4* génben a lehetséges genetikai variánsokat, Sanger-szekvenálást végeztem a gén teljes exon régióját és exon-intron határait lefedő primerek segítségével (lásd Módszerek).

Kiválasztottam hat eltérő expresszióval rendelkező (két nagyon alacsony, kettő közepes és kettő normális vagy magasabb expressziót mutató) egyént (16. ábra/A.). A szekvenálás eredménye három haplotípust (együtt öröklődő gyakori SNP-k, „allél”, H1, H2 és H3 a továbbiakban) és egy 5'UTR-ben, a promóter környékén elhelyezkedő variánst tárt fel (haplotípusok azonosítása: LDLink adatbázis – NIH NCBI, 16. ábra/B.), ezek közül egyik sem okoz a fehérjeszekvenciában változást, hiszen vagy nem kódoló régióban van, vagy szinonim SNP. Ezek közül a H1 (16. ábra/B. és C.) tűnt leggyanúsabbnak, hiszen a nagyon alacsony expressziót mutatókban homozigóta, a kicsit csökkent expresszióval rendelkezőekben heterozigóta és a két normál expressziót mutató egyénben homozigóta vad típusban volt jelen. Az NCBI adatbázis alapján a minor allél frekvenciája (MAF) is 0,1 körüli volt, mely magyarázhatja a vörösvértesteken megfigyelt expresszió eloszlást.

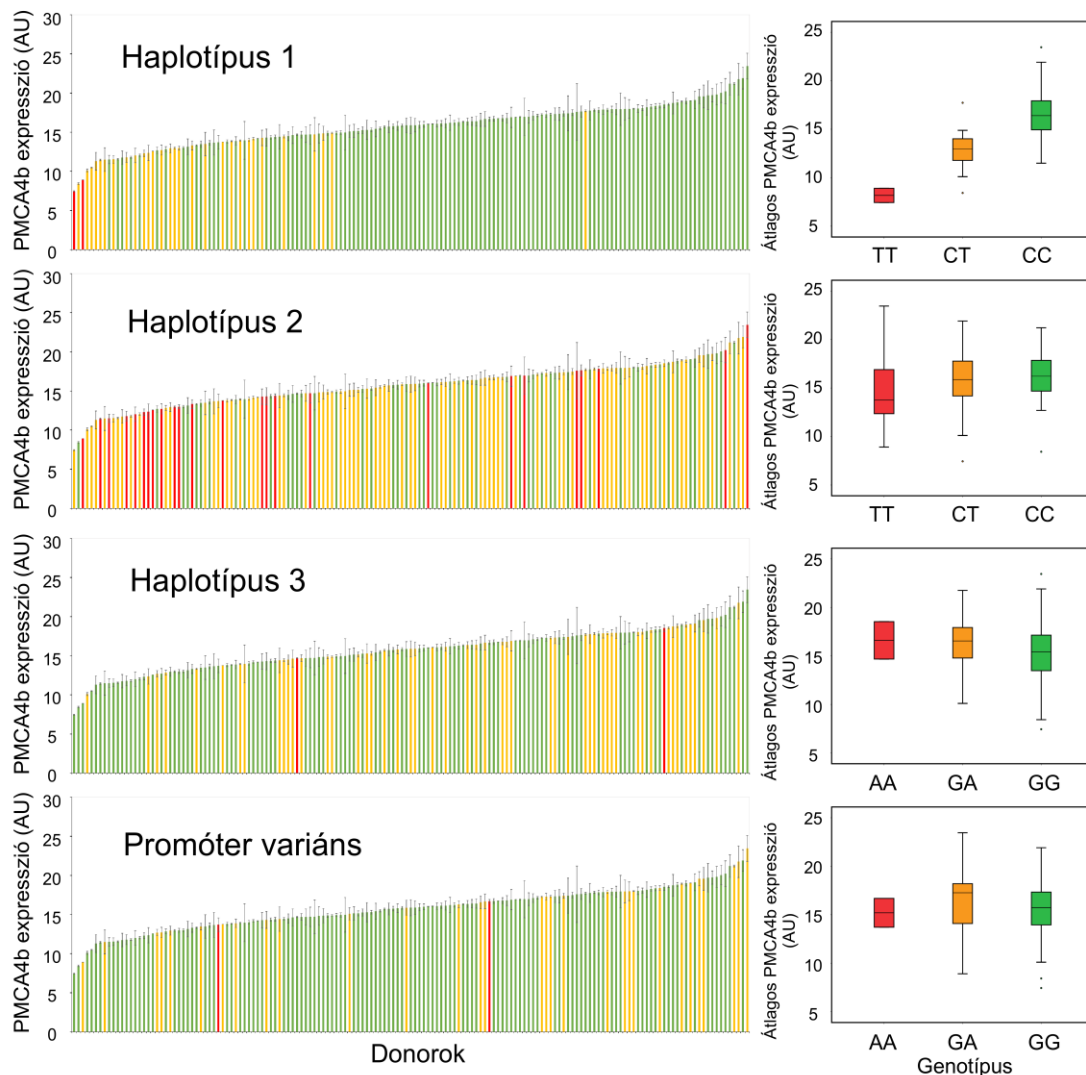
A.**B.**

	Haplotípus 1	Haplotípus 2	Haplotípus 3	Promóter variáns
K172	TT	CT	GG	GG
K110	TT	TT	GG	GA
K076	CT	CT	GG	GG
K007	CT	CT	GG	GG
K030	CC	CC	GG	GG
K006	CC	TT	GG	GA

C.

16. ábra: Az ATP2B4 exon-szekvenálás eredménye. **A.** A szekvenálás során vizsgált önkéntesek PMCA4b expressziója. **B.** A szekvenálás során feltárt haplotípusok és promóter variáns genotípusa a vizsgált egyéneknél. Piros: homozigóta hordozó, narancs: heterozigóta, zöld: homozigóta vad típus. **C.** Az ATP2B4 gén exon szerkezete és a haplotípusok és promóter variáns elhelyezkedése. (PMCA4b esetén a 20. exon nem kerül bele az mRNA transzkriptumba.)

Annak alátámasztására, hogy valóban a haplotípus 1 felelős a csökkent expresszióért több minta vizsgálatára volt szükség. A teljes önkéntes donor mintákon a három haplotípus SNP-i közül egy-egyre specifikus (ún. haplotípus jelölő vagy tagging SNP, lásd Módszerek) és a promóter variánsra specifikus qPCR genotipizáló próbákat futtattam, melynek eredménye azt mutatta, hogy valóban a haplotípus 1 felelős a csökkent PMCA4b fehérjeszintért ($p < 0,001$, 17. ábra és 5. táblázat).



17. ábra: A vörösvértest expresszió és a genotípus összefüggése TaqMan alapú qPCR alapján 155 egészséges véradó donoron. A haplotípus 1 heterozigóta formában nagyjából 75%-os PMCA4b expressziót, homozigóta formában 50% expressziót eredményez. A többi haplotípus és a promóter variáns sem volt hatással a vörösvértestek PMCA4b szintjére.

5. táblázat: Az egyes genotípusok és azokon belül az átlagos vörösvértestes PMCA4b expresszió.

	Genotípus	Átlagos PMCA szint \pm SD	n
Haplotípus 1	TT	8,1771 \pm 1,0404	2
	CT	12,9257 \pm 1,7900	29
	CC	16,4842 \pm 2,2529	124
Haplotípus 2	TT	14,5167 \pm 3,1870	25
	CT	15,7618 \pm 2,6973	79
	CC	16,2184 \pm 2,3127	51
Haplotípus 3	AA	16,6087 \pm 2,7266	2
	GA	16,3905 \pm 2,2263	52
	GG	15,3437 \pm 2,8778	101
Promóter variáns	AA	15,1984 \pm 2,1028	2
	GA	16,5170 \pm 3,1788	31
	GG	15,5149 \pm 2,5628	122
Összesen		15,7112 \pm 2,7060	155

A haplotípus 1 a gén 5' régiójában és az első két kódoló exon körül helyezkedik el, az intron 1-től az exon 2-ig tart (16./C. ábra). A proxy analízis arra is rávilágított, hogy több mint 50 SNP-t foglal magában (melyek között inszerciók és deléciók is vannak) a kapcsoltsági egyensúly vizsgálatok alapján ($R^2 > 0,9$, LDLink adatbázis). Európában az allélgyakorisága (MAF) 0,11 (NCBI SNP adatbázis) körül mozog, azaz nagyjából minden tizedik ember heterozigóta, és minden századik homozigóta. Érdekes megemlíteni, hogy a haplotípus 2 gyenge kapcsoltsági egyenlőtlenségben (linkage disequilibrium – LD) van a haplotípus 1-gyel (Pearson $R^2=0,1505$), valamint a haplotípus 3 pedig átfed a haplotípus 1-gyel (lásd 16./C. ábra), így ezek is szignifikánsnak adódtak a qPCR analízis alapján ($p<0,05$). Az összes haplotípus variáns Hardy-Weinberg egyensúlyt mutatott (Chi-négyzet teszt), és a hozzájuk tartozó MAF-ok az általam vizsgált emberek esetén a következők voltak: $q[H1]=0,1065$,

$q[H2]=0,4161$, $q[H3]=0,1806$, $q[PR]=0,1129$. Az általam vizsgált kontroll csoportra jellemző statisztikai adatokat az 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: Statisztikai és populációs adatok a 155 önkéntes véradó alapján.

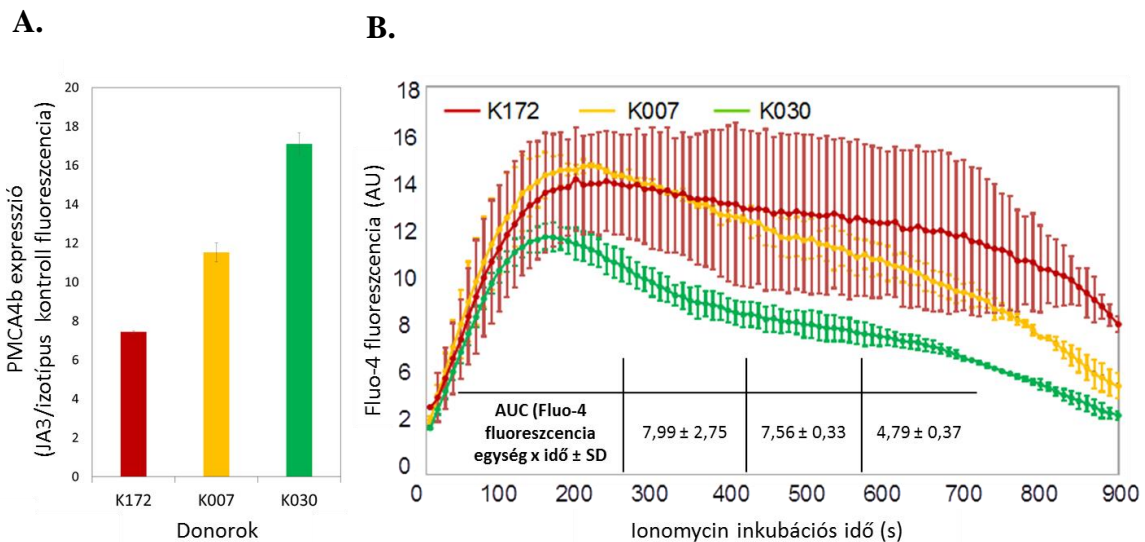
n=155 donor	p-érték expr. vs. genetika (Kruskal-Wallis próba)	- PMCA4b Hardy-Weinberg (Chi-négyzet teszt)	q (MAF)
Haplotípus 1	$p < 0,001$	0,9900	0,1065
Haplotípus 2	$p=0.012$	0,9113	0,4161
Haplotípus 3	$p=0.040$	0,4163	0,1806
Promóter var.	$p=0.216$	0,9999	0,1129

5.1.4 Kalcium efflux mérések vörösvértesteken

Eddig úgy gondoltuk, hogy a vörösvértesteken a PMCA4b megfelelően magas szintje – mivel ez van nagy számban jelen a membránjában - fontos a sejt fejlődése és túlélése szempontjából, ezért meglepő volt számunkra, hogy találtunk egy olyan haplotípust, mely jelentősen csökkenti a fehérje szintjét ezeken a sejteken. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon ez a csökkent expresszió hatással van-e a PMCA funkciójára, azaz a kalcium transzportra a membránon keresztül. Éppen ezért beállítottam egy olyan módszer, mely során a vörösvértesteket Fluo-4 kalcium indikátorral töltöttem meg, majd egy enyhe ionomycines (ionofór) kezelést követően mértem a kalcium bejutását, illetve kipumpálását élő vörösvértesteken. A puffer összetételének megfelelő beállítása rendkívül fontos volt, hogy a beáramló kalcium ne indítsa el a Gárdos csatorna által előidézett nagymértékű dehidratációját és pusztulását a vörösvértesteknek (lásd Módszerek és Bevezetés). A mérést folyamatos mintavételezésével végeztem az áramlási citométeren, így lehetővé vált valós időben, egy azon mintán az intracelluláris kalcium szintet nyomon követni.

A mérést egy – a haplotípus 1-re homozigóta hordozó – donor, egy heterozigóta és egy vad típusú donor vörösvértestjein végeztem el. A vad típusú donor mérései alapján úgy találtam, hogy a normál vörösvértestek 15 perc alatt képesek az ionofór hatására megnövekedett intracelluláris kalcium szintet visszaállítani az eredeti alacsony

szintre (18. ábra). Ezt a mérést megismételve vanadát hozzáadásával, mely gátolja a PMCA4b funkcióját, a Fluo-4 fluoreszcenciája 15 perc elteltével sem csökkent le, azaz a pumpa funkció gátolható is volt (lásd Módszerek). A heterozigóta és homozigóta egyén vörösvértestjein is sérült PMCA4b funkciót tapasztaltam, azaz a mérési időintervallumban a vörösvértestjeik nem voltak képesek maradéktalanul kipumpálni a bejutó kalciumot. Ezzel sikerült alátámasztanunk, hogy a csökkent fehérjeszint a membránban a pumpafunkció romlásával is együtt jár, annak ellenére, hogy ezek az emberek teljesen egészségesek és semmiféle vörösvértestéréshez vagy eriptóizishoz kapcsolható betegségről (pl. anémia, csökkent hemoglobin szint) nem nyilatkoztak.

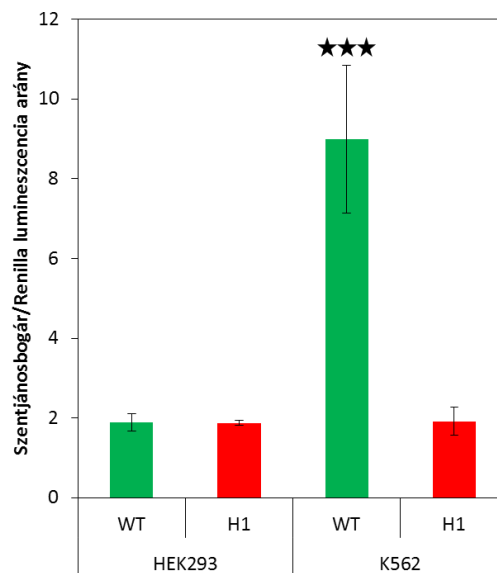


18. ábra: Vörösvértesteken végzett Fluo-4 alapú kalcium transzport mérések. A. A mérésben részt vevő donorok PMCA4b expressziója. Vörös: H1 hordozó homozigóta, sárga: H1 heterozigóta, zöld: H1 vad típus. **B.** A Fluo-4 alapú kalcium transzport mérések során az ionomycin hozzáadását követően az intracelluláris kalcium szint megemelkedett. A normál, haplotípus 1-re vad típusú donor vörösvértestjei (zöld), melyek átlagos mennyiségű PMCA4b fehérjével rendelkeztek, 15 perc alatt eltávolították a bejutó kalciumot a citoplazmából. Az alacsonyabb expresszióval rendelkező heterozigóta (sárga) és homozigóta (vörös) haplotípus 1 hordozó donorok esetén a pumpafunkció romlása volt megfigyelhető. AUC: görbe alatti terület (area under the curve), 3 független mérés eredménye.

5.1.5 Dual-luciferáz mérések a haplotípus hatásának vizsgálatára

A haplotípus génexpresszióra kifejtett hatását dual-luciferáz esszével vizsgáltam meg. Ez a rendszer két emlős expressziós plazmidból áll, egy minta plazmidból, amely az általunk vizsgálni kívánt promóter vagy enhanszer régiót tartalmazza, mely után egy szentjánosbogár luciferáz van. A kontroll plazmid egy általános, gyenge expressziójú timidin kináz promóterrel rendelkezik, mely után a Renilla luciferáz van beépítve. A két plazmid ko-transzfekciója után a kétféle luciferáz expressziós aránya (szentjánosbogár luciferáz/Renilla luciferáz lumineszcencia) határozza meg, hogy a minta plazmidba beépített vizsgálandó szakasz milyen hatékonysággal működik. A minta konstrukciónkba beépítettük a haplotípus legelől („legupstreamebb” irányban) elhelyezkedő, vad típusú és az SNP-et hordozó régiót. (lásd Módszerek 6.)

Az eredmények azt mutatták, hogy a haplotípusnak csak az eritroid eredetű K562 sejtekben volt expressziót csökkentő hatása, a kontroll HEK293 sejtekben nem volt hatása az expresszióra (19. ábra). Tehát ez a régió egy eritroid specifikus enhanszer, mely más sejtvonalakban nagy valószínűséggel nem működik.



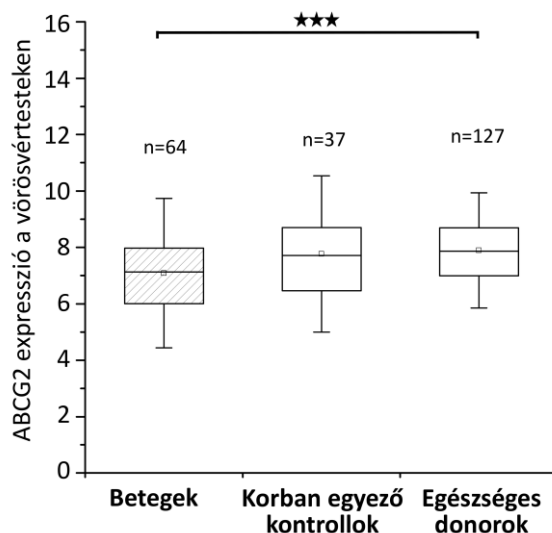
19. ábra: A haplotípusnak csak a K562 eritroid eredetű sejtvonalakban van hatása az expresszióra. Az eritroid eredetű K562 sejtekben a vad típusú régióról nagyobb expresszió volt megfigyelhető a vad típushoz hasonlítva ($p < 0,001$, t-teszt). A haplotípus SNP-it beépítve ez az expresszió a HEK-hez hasonlóra csökkent. Zöld: vad típusú konstrukció (WT), piros: haplotípus hordozó konstrukció (H1).

5.2 Az alacsonyabb ABCG2 fehérjeszintet okozó genetikai variánsok nyomában

5.2.1 ABCG2 fehérjeszintek meghatározása áramlási citométerrel köszvényes és kontroll emberektől származó vörösvértesteken

Az Országos Reumatológiai és Fiziológiás Intézetben Professzor Poór Gyuláékkal ABCG2 vörösvértest felszíni expressziós vizsgálatokat végeztünk köszvényes betegekben, hiperurikémiás embereken és a hozzájuk korban és nemben illő kontroll csoportban, valamint szintén méréseket végeztünk a saját belső, intézeti kontroll csoportunkon is (lásd Módszerek). Szerettük volna megtalálni azokat a hazai populációban is előforduló ABCG2 genetikai variánsokat, melyek befolyásolhatják a köszvény kialakulását és lefolyását, valamint mivel az ABCG2 sok gyógyszer felszívódását befolyásolja, ezek a vizsgálatok a későbbi személyre szabott gyógyszerhatóanyag beállításokban is fontosak lehetnek (lásd Célok és Bevezetés).

64 köszvényes betegen, 37 nemben és korban illő kontroll és 127 egészséges (intézeti) kontroll egyén vörösvértestjein végeztük el az ABCG2 fehérjeszint méréseket. Összehasonlítva a köszvényes csoportot a teljes kontroll csoporttal megállapítottam, hogy az ABCG2 fehérje szintje szignifikánsan csökkent a betegeken (20. ábra).

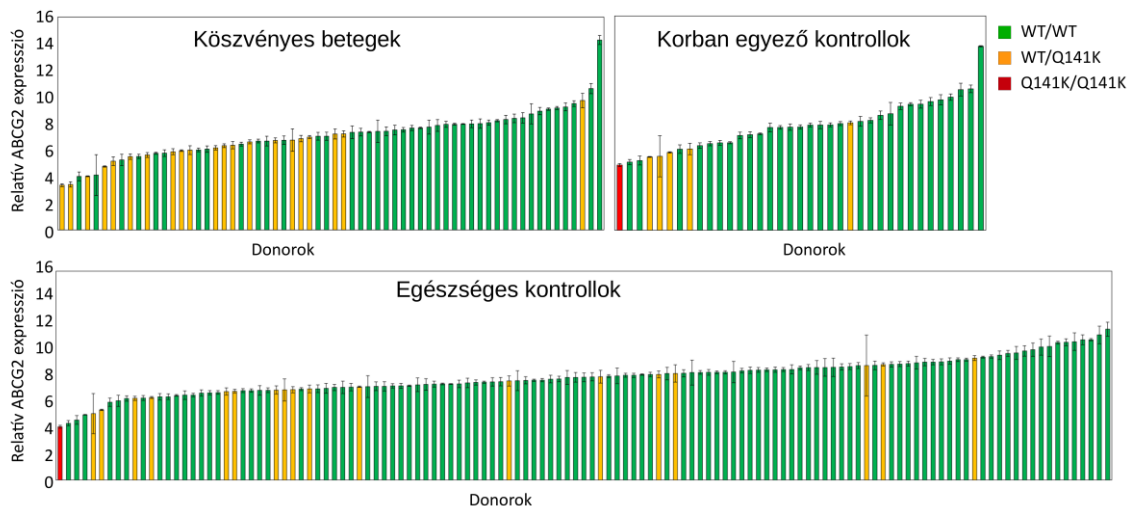


20. ábra: Köszvényes betegek, korban egyező kontrollok és egészséges donorokon mért átlagos ABCG2 expresszió vörösvértesteken. A köszvényes betegek ABCG2 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollokéhoz viszonyítva. (Mann-Whitney teszt, STATISTICA)

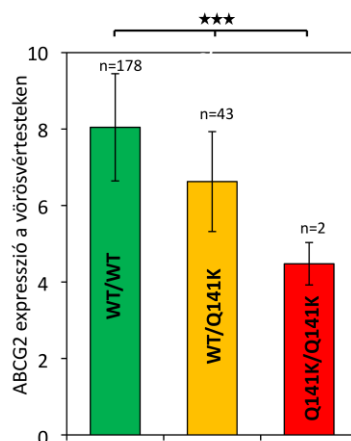
5.2.2 Az ABCG2 qPCR genotipizálás és Sanger-szekvenálás eredmények

A korábbi eredmények alapján tudtuk, hogy a populációban egy gyakori variáns, a Q141K jelen van, mely befolyásolja az ABCG2 fehérjeszintet vörösvértesteken (120). Ezért TaqMan-alapú genotipizáló próbával megvizsgáltam erre a variánsra a teljes kontroll és köszvényes csoportot. Az eredmények azt mutatták, hogy ez az SNP mind heterozigóta, mind homozigóta formában gyakoribb volt az alacsonyabb expressziójú egyének között (21. ábra/A.), illetve feldúsultak a köszvényes egyének között ($p < 0,001$, t-próba). A heterozigóta egyéneknek az átlagos vörösvértest ABCG2 expressziós szintje $82\% \pm 17\%$, a homozigóta hordozóknak $56\% \pm 7\%$ volt a homozigóta vad típusúakhoz viszonyítva (21. ábra/B.).

A.

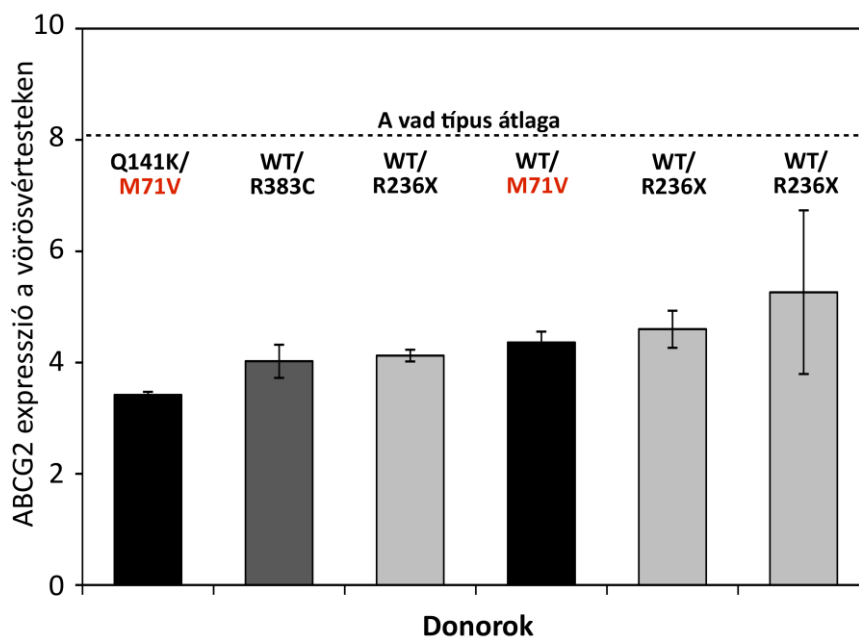


B.



21. ábra: Vörösvértest ABCG2 expresszió és a Q141K SNP viszonya. **A.** A Q141K gyakoribb volt az alacsonyabb expressziójú emberek között mind köszvényes, mind egészséges véradó donorok esetén. **B.** A Q141K variáns szignifikánsan csökkenti az ABCG2 expressziót vörösvértesteken.

Néhány önkéntes véradó donor esetén a vörösvértest ABCG2 expresszió csökkenése nem volt magyarázható a Q141K jelenlétével (mindannyian közel 50%-os ABCG2 expressziót mutattak). Ezekben az esetekben Sanger-szekvenálást végeztem a gén teljes kódoló és exon-intron határ régióin. Találtam három egyént, akik heterozigóta formában hordozták az R236X mutációt, mely a fehérje korai terminálódását és lebontását okozza. Erről a mutációról már ismeretes volt, hogy a hazai populációban jelen van és a fehérjeszint jelentős csökkenését okozza (120). Találtam egy embert, aki az R383C variánst hordozza. Mindezek mellett két (egy köszvényes és egy kontroll) egyénben találtam egy új, eddig nem karakterizált, M71V aminosavcserével (n.211A>G, rs148475733) járó mutációt. Ez a mutáció is körülbelül felére csökkent expressziót okoz heterozigóta formában, míg az egyik egyén esetén a Q141K is jelen volt heterozigóta formában, együtt a két variáns még alacsonyabb fehérjeszintet eredményezett (22. ábra).



22. ábra: Vörösvértest ABCG2 expresszió néhány esetén és a kapcsolódó genetikai variáns. A kontrollok és köszvényes betegek között is találtunk néhány egyént, akinek az expressziója körülbelül fele volt a vad típus átlagának (szaggatott vonal). Sanger-szekvenálással kimutattuk, hogy mindegyikük az ABCG2 valamelyik ritka variánsát hordozza. A korábban ismert R236X és R383C mellett találtunk egy új variáns, az M71V-t (pirossal jelölve).

A továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy az M71V és a többi, már ismert variáns a hazai populációban milyen gyakorisággal fordul elő. További 278 egészséges véradó donorból (Országos Vérellátó Szolgálat, Dr. Andrikovics Hajnalka) származó DNS-en megvizsgáltam a mutációk jelenlétét qPCR alapú genotipizáló próbákkal. Az M71V a többi ritka variánshoz viszonyítva hasonló gyakoriságban fordul elő, a magyar (kaukázusi eredetű) populáció körülbelül 1%-a heterozigóta formában hordozza (7. táblázat).

7. táblázat: A Q141K és a ritka variánsok előfordulása a hazai populációban 405 emberen vizsgálva. MAF: minor allél frekvencia, HW: Hardy-Weinberg egyensúlyi érték, n.m.: nem meghatározott.

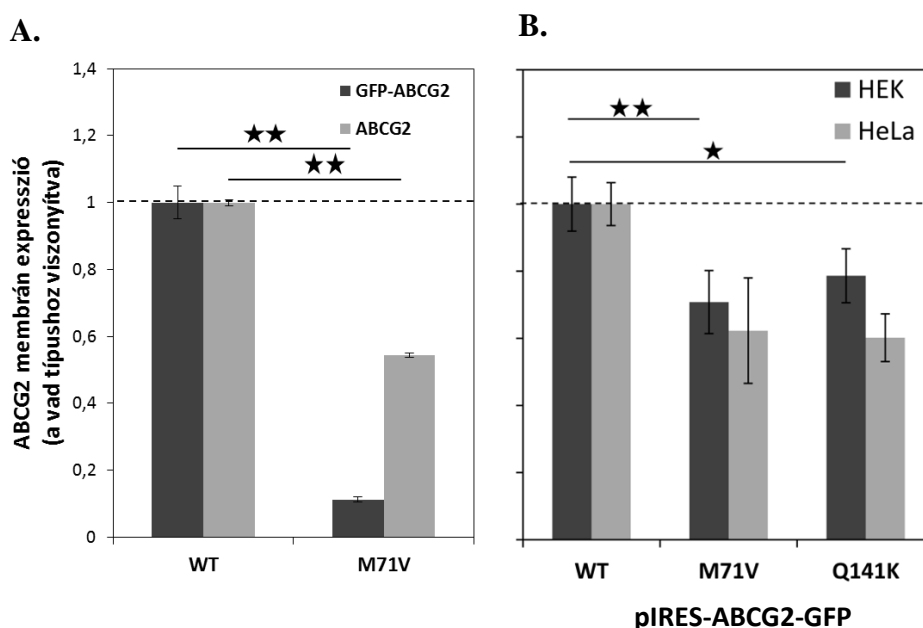
Összes normál konroll DNS (n=405)					
	homoz.	heteroz.	vad típus	MAF	HW (χ^2)
Q141K	5	68	332	0,0963	0,8941
M71V	0	4	401	0,0049	0,9950
R236X	0	3	402	0,0037	0,9972
R383C	0	0	405	n.m.	n.m.

5.2.3 Membrán expressziós vizsgálatok emlős sejteken

Mivel korábban még senki sem jellemezte kísérletesen az M71V mutációt, ezért mi először szeretnénk volna *in vitro* emlős sejt kultúrákban a fehérje kifejeződését megvizsgálni. Ebből a célból irányított mutagenézissel létrehoztunk az M71V mutációt hordozó háromféle vektort (lásd Módszerek). A pcDNA vektor címke nélküli formában tartalmazza az ABCG2-öt. Mivel szeretnénk volna lokalizáció szempontjából is vizsgálni a fehérjét, így egy pEGFP-ABCG2 vektort is létrehoztam. A pIRES-GFP vektor tartalmaz egy IRES (Internal Ribosome Entry Site, belső riboszóma belépési hely) szekvenciát, mely lehetővé teszi az ABCG2 fehérje és a GFP közös transzkripcióját, de külön történő translációját a képződött mRNS-ről. Ez utóbbi vektornak számos előnye van, ugyanis a fehérjénkre nincs kovalensen semmi sem kötve, de a transzfektálódott sejteket a GFP jele alapján azonosítani tudtuk. A pEGFP vektor hátránya, hogy kis mértékben hatással van az expresszióra összehasonlítva a tag nélküli verzióval HEK sejteken mérve (23./A. ábra), habár korábbi eredményeink alapján tudtuk, hogy a

funkciója nem változik meg a vad típusú ABCG2-nek N-terminális GFP címke hatására. A kísérletekhez két olyan emlős sejtet választottam, melyek nem, vagy csak nagyon alacsony mértékben expresszálják az ABCG2 fehérjét, ezek a sejtek humán embrionális vesesejtek (HEK293) és humán méhnyakrák eredetű (HeLa) sejtek voltak. A mérésekhez az ABCG2 külső epitópját felismerő (5D3) antitestet használtam, és áramlási citométeren végeztem (lásd Módszerek). Az M71V mellett a vad típusú és az általunk korábban és mások által is jól karakterizált (lásd Bevezetés) Q141K variáns hordozó fehérje expresszióját is vizsgáltam összehasonlítás céljából.

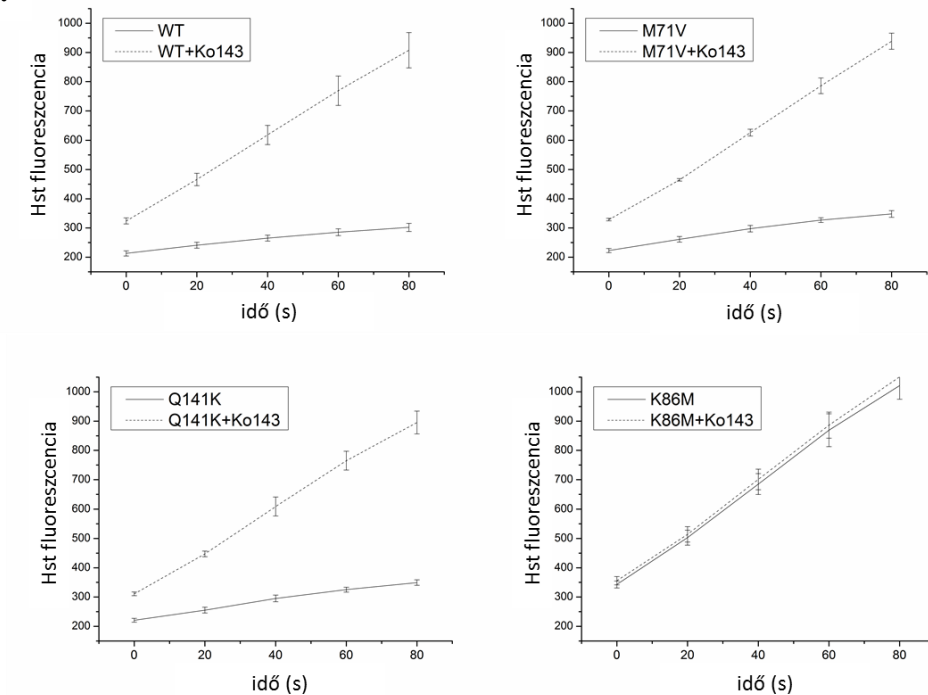
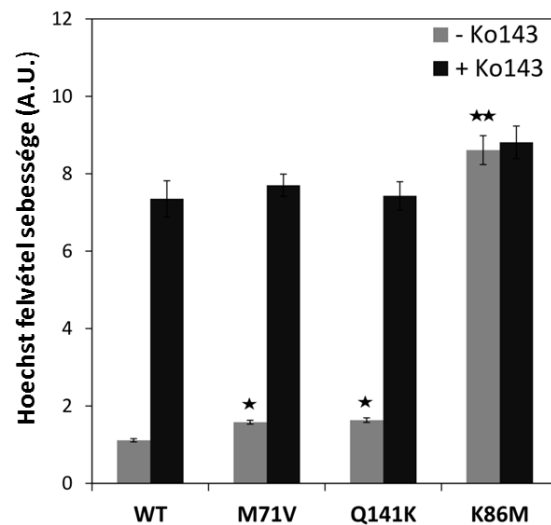
Az 23./B. ábra mutatja, hogy mind HEK293, mind HeLa sejtekben az M71V fehérje szintje körülbelül 60-70%-a a vad típusúhoz viszonyítva, hasonlóan a Q141K variánshoz. Vagyis ugyanúgy, mint a vörösvértesteken, a tranziens expressziós kísérletekben is csökkent membránfehérje szintet tapasztaltunk.



23. ábra: ABCG2 vad típusú és variáns hordozó fehérjék expressziója emlős sejtekben. **A.** A pEGFP-ABCG2 GFP-tagget tartalmazó és a címkét nem tartalmazó pcDNA-ABCG2 vektorok közötti különbség HEK293 sejteken mérve. Az N-terminális GFP drasztikusan csökkentette a variáns hordozó kazettáról az expressziót a vad típusúhoz képest. **B.** A pIRES2-ABCG2-GFP kazettáról történő expresszió HEK és HeLa sejtekben, csak a transzfektálódott sejteket vizsgálva GFP jel alapján. Mind az M71V, mint a Q141K variáns szignifikánsan csökkentette az expressziót mindkét sejt típusban.

5.2.4 Funkcionális vizsgálatok emlős sejteken

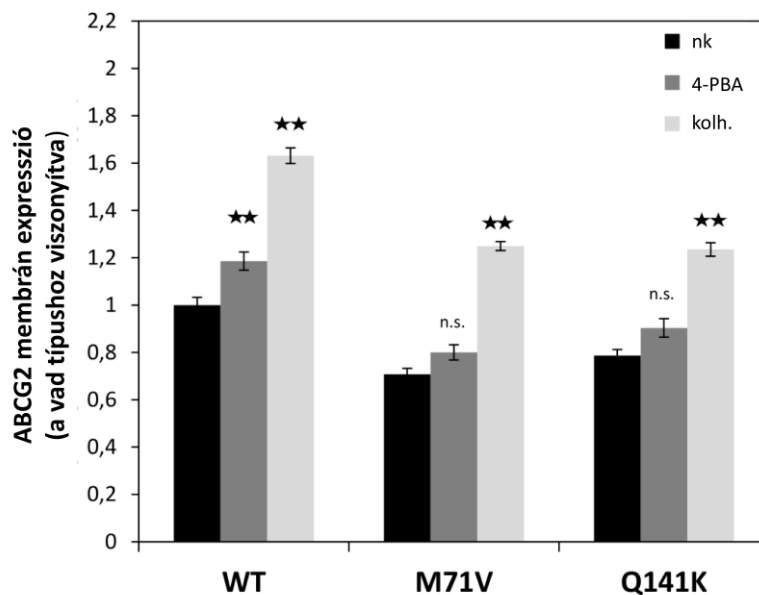
Megvizsgáltuk az M71V aminosavcsere hatását az ABCG2 transzport funkciójára. Az ABCG2 rendkívül sokféle anyagot képes transzportálni, köztük sok fluoreszcens vegyületet is, mely lehetővé teszi, hogy a funkcióját egyszerűen vizsgálhassuk áramlási citométerrel. Ebben az esetben egy széles körben használt, Hoechst 33342 (Hst) nevű festék felvételét vizsgáltuk vad típusú és M71V hordozó fehérjét tranziensen expresszáló sejteken. Szintén az IRES-t tartalmazó vektort használtuk, hogy elkülöníthessük a transzfektált sejteket a nem transzfektáltaktól GFP fluoreszcencia alapján (lásd részletesebben a számítás menetét a Módszerek részénél). A 24./A. ábrán a kezdeti lineárisban mért fluoreszcencia értékeket és az illesztett egyeneseket mutatom be a vad típusú és mutáns verziójú ABCG2 esetén. A 24./B. ábrán látható, hogy a K86M katalitikus hely mutáns fehérjével ellentétben a WT, Q141K és az M71V aminosavcserét hordozó fehérje transzportálta a Hst-öt. Ko143 specifikus ABCG2 inhibitorral a Hst akkumuláció megnövekedet, azaz gátoltuk a transzportot. Vagyis a fehérje funkcionális, a mutáció az expressziót csökkenti vagy a fehérje lebomlása nő meg.

A.**B.**

24. ábra: Az ABCG2 különféle variánsainak funkcionális vizsgálata Hoechst 33342 szubsztrát segítségével HEK293 sejteken. **A.** A mérések során négyféle fehérjeszekvenciát tartalmazó pIRES plazmiddal transzfektáltuk a sejteket és 48 óra elteltével Hst hozzáadásával mértük a pumpafunkciót. A kezdeti lineáris fázisra illesztettünk egyeneseket. A mérést ABCG2 specifikus Ko143 gátlószerrel is elvégeztük. A vad típus mellett a vizsgált mutánsok az M71V, Q141K és a K86M katalitikusan inaktív fehérjék voltak. **B.** A mért kezdeti meredekségek a Hst transzport kísérlet során. Az M71V és Q141K variáns is működik, bár valamennyivel csökken a szubsztrát transzportáló képessége. Ko143: ABCG2 specifikus gátlószer.

5.2.5 A sérült ABCG2 fehérje kíségetése a membránba kémiai chaperonok kíségetéével

Mivel a fehérje funkciója jelentősen nem sérült, ezért megpróbáltuk különféle kémiai chaperonok kíségetéével kíségeteni a fehérjét a membránba. A kolhicinről és a 4-fenilbutirátról (4-PBA-ról) már voltak korábbi ismeretek, hogy bizonyos ABC-típusú fehérjék transzkripcióját, expresszióját vagy foldingját elősegítik (165, 171), emellett klinikai tesztekben is jól szerepeltek több ABC-transzporterhez köthető betegség kapcsán (172, 173). HEK sejteket kezeltem 24 órán át 1 mM 4-PBA-val vagy 1 μ M kolhicinnel, és azt tapasztaltam, hogy 4-PBA szignifikánsan emelte a vad típusú fehérje felszíni kifejeződését. A mutáns verziók esetén nem szignifikánsan, de kis mértékben emelte a fehérje szinteket. A kolhicin kezelés mind a vad típusú, mind a mutáns ABCG2 szintjét növelte a membránban (25. ábra).



25. ábra: A variánst hordozó ABCG2 kíségetése a membránba kémiai chaperonokkal. A 4-PBA hatására a vad típusú fehérje mennyisége szignifikánsan megnőtt a membránban, de a többi variáns esetén is emelkedés volt megfigyelhető a fehérjeszintekben. A kolhicin mind a vad típus, mind a variánsok expresszióját szignifikánsan megnövelte.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 A PMCA4b-t kódoló *ATP2B4* génben talált haplotípus jellemzői

6.1.1 A haplotípus nem okoz változást a fehérje szekvenciájában

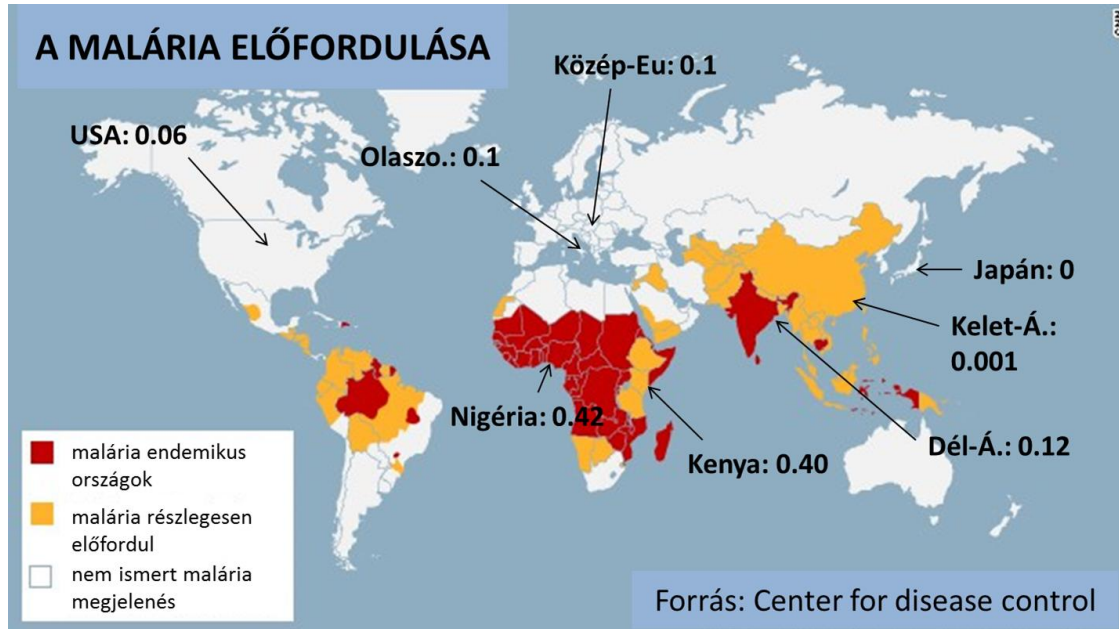
Az *ATP2B4* génre jellemző, hogy kevés aminosavcserével vagy kereteltolódással járó mutáció található benne. Ezek jellemzően kóros folyamatokhoz vezetnek. Az R18H mutációnak az autizmus kialakulásában van szerepe (174). Az R268Q variánst az öröklődő végtagbénulással hozták összefüggésbe (175). Munkánk során egészséges embereket vizsgálva nem találtunk hasonló, aminosavcserével járó mutációt, de mégis sok önkéntes véradónk vörösvértestjein csökkent PMCA4b expressziót figyeltünk meg. A TaqMan alapú, nagy mintaszámú genotipizálással bebizonyítottuk, hogy egy haplotípus felelős a megfigyelt csökkent expresszióért. A haplotípus SNP-i vagy intronikus régióban fordulnak elő, vagy nem okoznak aminosavcserét a fehérjében.

6.1.2 A haplotípus védeltséget biztosít maláriával szemben

Nagy átereszítő genomiális vizsgálatok (GWAS) kimutatták, hogy a haplotípus védeltséget biztosít súlyos gyermekkori maláriával szemben (176) és a terhesség során a placentális fertőzöttség is szignifikánsan alacsonyabb volt a haplotípus hordozó anyák esetén (177). A malária az egyik leginkább kutatott fertőző betegség a világon, habár a molekuláris alapjai annak, hogy a *Plasmodium* fajok hogyan képesek túlélni és osztódni az emberben még nem teljesen ismert. A szoros együttélés, a ko-evolúciós hatások eredményeként számos allél megőrződött az emberi genomban, melyek bizonyos fokú védeltséget biztosítanak (178, 179). Az egyik ilyen allél lehet az általunk leírt haplotípus. Ez a haplotípus nagy valószínűséggel a parazita vörösvértest fázisa során biztosít a fertőzéssel szemben védeltséget; megakadályozza a vörösvértest felszínére kötődést, a parazita bejutását vagy a vörösvértesten belüli szaporodását.

A malária endemikus előfordulása (forrás: CDC) összefüggést mutat a haplotípus hordozók számával (NCBI adatbázis, 1000 genom projekt). Nigériában, Kenyában és más közép-afrikai országokban is a haplotípus minor allél frekvenciája

0,4-0,5 körül van (26. ábra), míg más országokban az előfordulása jóval alacsonyabb. Ez az adat szintén azt támasztja alá, hogy a haplotípus fennmaradásának evolúciós háttere a maláriafertőzés elleni védettség lehet.

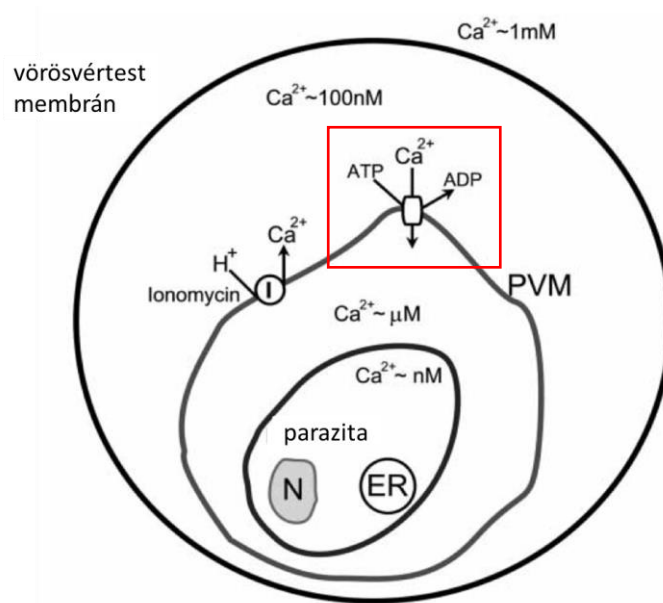


26. ábra: A malária előfordulása és a haplotípus minor allél frekvenciája közötti összefüggés. A malária endemikus területeken jóval gyakoribb a haplotípus hordozók aránya. (Kép forrása: CDC, minor allél frekvencia adatok forrása: NCBI adatbázis, 1000 genom projekt)

6.1.3 A PMCA4b szerepe a maláriában

A PMCA4b szerepe a *Plasmodium* életciklusában még nem ismert. Gazarini és munkatársai (180) azt feltételezik, hogy a PMCA a parazita és a vörösvértest citoplazmáját határoló parazitofór vakuoláris membránba (PVM) kerül az invázió során (27. ábra). A parazita internalizációja során a PMCA olyan irányultságban áll, hogy a parazitofór vakuólumba (PV-be) pumpálja a citoszólból a kalciumionokat. A *Plasmodium* így a vörösvértest saját PMCA fehérjéit felhasználva képes kialakítani a szaporodásához szükséges magas kalcium-ion koncentrációt a PV-ben. Ennek a modellnek ellentmond, hogy maláriás fertőzés során a PMCA gátlását figyelték meg vörösvértesteken (54). Az is kérdéses, hogy a gazda fehérjéi egyáltalán megtalálhatóak-

e a PVM-ben. Egyes feltételezések szerint a gazda vörösvértestének membránfehérjei kizáródnak belőle és csak a parazita saját pumpái találhatók meg itt (181).



27. ábra: Egy modell a PMCA szerepére a malária fertőzött vörösvértestek esetén. A *Plasmodium* parazita a vörösvértesteken belül egy parazitofór vakuoláris membránt hoz létre a vörösvértest membránjának felhasználásával. A PMCA ebben a membránban a parazita felé képes a citoszólból kalciumot pumpálni (pirossal jelölve), mely a parazita szaporodásához szükséges megfelelően magas kalcium koncentrációt tartja fenn. (kép forrása: Gazarini és mtsai (180), módosítva)

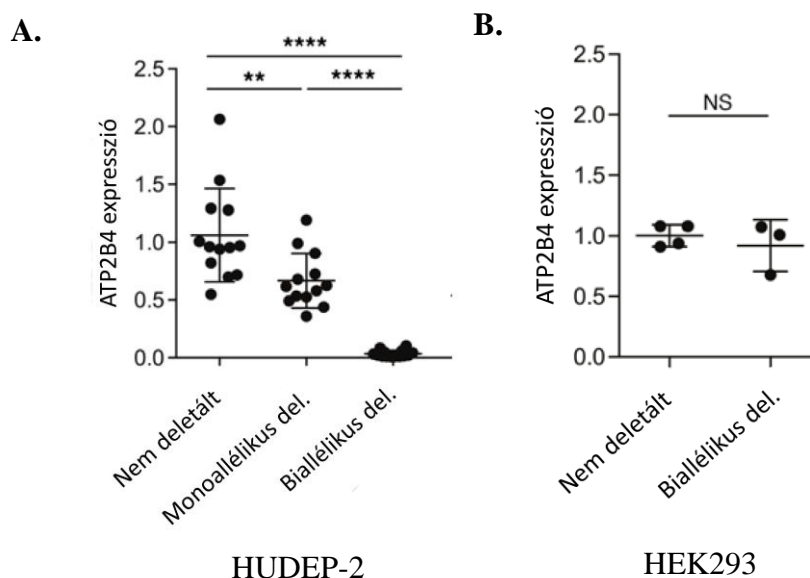
Ha a modell helytálló, akkor a haplotípus hatására a sejtfelszíni PMCA4b expresszió csökken, így a PVM-be is kevesebb kerül a parazita internalizációja során. Ebben az esetben nem alakul ki a *Plasmodium* szaporodásához szükséges magas kalcium-ion koncentrációjú környezet a PV-ben, emiatt a haplotípus hordozók védettebbek a fertőzéssel szemben.

6.1.4 A haplotípusnak csak az eritroid sejtvonalakban van hatása az expresszióra

A PMCA4 fehérje a szervezetben mindenhol expresszálódik (181). Habár a gén kiütése nem letális (ellenben a PMCA1 fehérje kiütésével, mely embrionális korban letalitást okoz), a PMCA4 KO egerekben a portális véna simaizmainak apoptózist

figyelték meg (182). Emellett, mivel a fő kalciumpumpája a hímvarsejteknek, a hím állatok sterilizációját okozta. A vizsgálataink során a haplotípushordozók között szerepeltek többgyermekes édesapák is, így feltételezhetően a haplotípusnak nincs hatása a reprodukcióra. A hordozók szintén nem nyilatkoztak érrendszeri betegségről.

Lessard és mtsai (183) a haplotípus-régió upstream irányban elhelyezkedő intronikus szakaszát CRISPR/Cas-9 segítségével kivágták eritroid HUDEP-2 és HEK293 sejtekben. Az eritroid sejtvonalban a szakasz hiánya gyakorlatilag az mRNS expresszió teljes eltűnését eredményezte, míg HEK sejtekben a kivágásnak nem volt hatása a génexpresszióra (28. ábra). Dual-luciferáz esszé segítségével mi is alátámasztottuk ezt a megfigyelést (lásd Eredmények 19. ábra). A *Lessard és mtsai* által vizsgált régiót a szentjánosbogár luciferáz elé helyeztük. A vad típusú régió esetén csak a K562 eritroid eredetű sejtekben volt mérhető expresszió. Azonban a haplotípus SNP-it hordozó szakasz esetén az expresszió ugyanakkorára csökkent, mint a HEK sejtekben. Tehát a haplotípus-régió része egy eritroid specifikus enhanszer, mely a vörösvértest érése során az expresszió irányításáért felel. Nagy valószínűséggel a haplotípus ennek az enhanszernek a működését befolyásolja.



28. ábra: A haplotípus kezdeti szakaszának kivágása CRISPR/Cas-9 rendszerrel.

HUDEP-2 eritroid sejtvonalban (A.) a régió kivágása az mRNS expresszió teljes megszűnésével járt, míg HEK293 sejtekben (B.) a kivágásnak nem volt hatása az expresszióra. (kép forrása: *Lessard és mtsai* (183), módosítva)

Egy másik nagy áteresztőképességű genomiális vizsgálat kimutatta, hogy a haplotípust hordozóknak alacsonyabb az átlagos hemoglobin koncentrációjuk (MCHC) a vörösvértestekben (184). Azt feltételezzük, hogy a kalciumionoknak a hemoglobin beépülésének szabályozásában lehet szerepe, melyet a PMCA a vörösvértest érése során aktívan befolyásol.

6.2 Az *ABCG2* gén és a talált variánsok

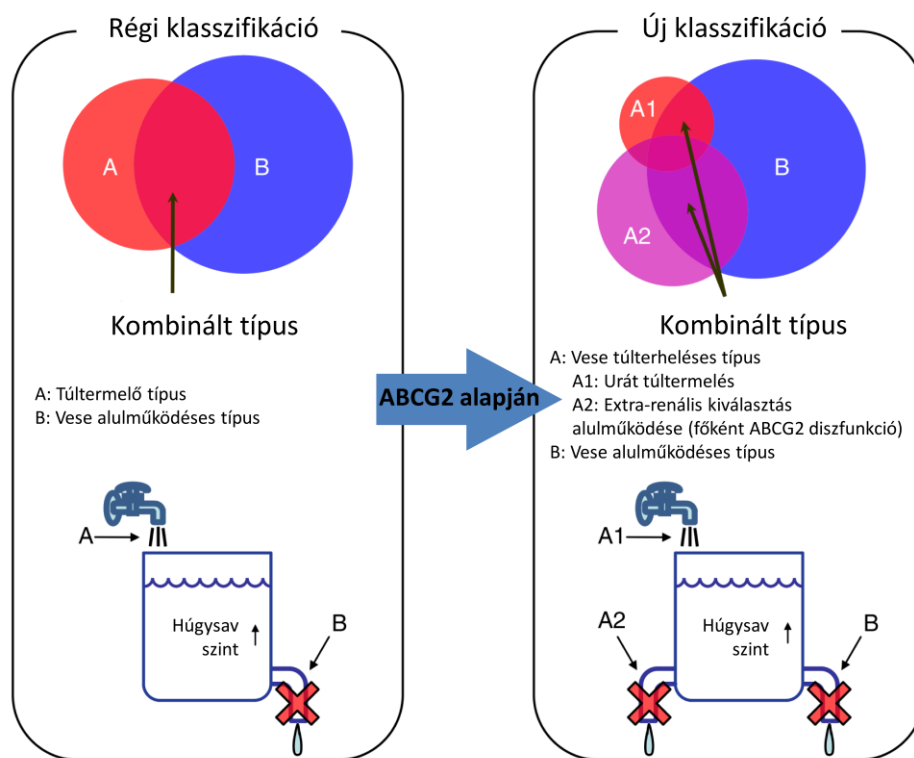
6.2.1 Az *ABCG2* szerepe a köszvényben

A köszvény az egyik világvezető, az életminőséget jelentősen rontó megbetegedés. Kialakulásának előfeltétele a magas szérum húgysav szint, mely létrejöhet a purinanyagcsere fokozódása miatt (185), vagy a húgysavkiválasztás sérülése miatt is (186). A húgysav az ízületekben felhalmozódik és kristályokat képez, mely azután súlyos gyulladásos folyamatokat indít be.

A köszvény kialakulása nagyban függ a táplálkozástól és környezeti faktoroktól, emellett családi halmozódás is megfigyelhető, ami valószínűsíti, hogy a betegségnek genetikai háttere is van (187–189). A betegség hátterében nem egyetlen gén egyetlen mutációja áll. A legújabb nagy áteresztőképességű genomiális vizsgálatok (GWAS – genome wide association studies) számos gént azonosítottak, többek között gyulladásos faktorokat, anyagcsere enzimeket és urát transzportereket (190). Ezekben a génekben jelenlevő variánsok befolyásolják a húgysav anyagcserét vagy a kiválasztást. Az *ABCG2* Q141K variánsáról több GWA vizsgálatban bebizonyították, hogy jelentősen megemelkedett szérum húgysav szintet okoz (191–194) és a köszvényes betegekben gyakrabban fordul elő, mint a kontroll populációban (195–198). A vizsgálataink során mi is ki tudtuk mutatni, hogy a Q141K variáns a köszvényes betegekben feldúsul. Emellett a kontroll csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb átlagos *ABCG2* szint volt jellemző a köszvényes betegek vörösvértestjeinek a felszínén, amit részben a Q141K variáns gyakoribb előfordulása okozhat.

Az *ABCG2* fiziológiásan megtalálható a vesében, így sokáig az a nézet volt uralkodó, hogy egyéb transzporterekkel együtt (URAT-1, GLUT9, NPT-1) a vesén

keresztüli urát kiválasztást befolyásolja. Az *ABCG2* génkiütött egerek szérumban húgysav szintje jelentősen megemelkedett (199), ami alátámasztja az *ABCG2* szerepét a hiperurikémia kialakulásában. Emellett megfigyelték, hogy a vesén keresztüli frakcionális húgysav exkréción ezekben az egerekben jelentősen megnőtt, míg a bélben keresztüli kiválasztás lecsökkent. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *ABCG2* inkább a bélben játszhat szerepet a húgysav eltávolításában. Az új eredmények fényében a köszvény csoportosítása is átalakult; megkülönböztetnek vese alulműködéses és vese túlterheléses típust, mely esetben a vese kiválasztása nem sérül, sőt, a magas szérumban húgysav miatt a kiválasztás jelentősen megnő. Az utóbbi csoportba tartozik a metabolikus urát túltermeléses típuson kívül a sérült bél (extra-renális) kiválasztást produkáló típus is, mely elsősorban az *ABCG2* nem megfelelő működéséből fakad (29. ábra) (200). Az *ABCG2* génben lévő bármely olyan mutáció vagy variáns, mely a



29. ábra: A köszvény régi és új csoportosítása. Az *ABCG2* genotípus ismeretének hiányában a régi csoportosítás a húgysav vesén keresztüli kiválasztásán alapult (bal panel). Az *ABCG2* genotípus ismeretében a vese túlterheléses típuson belül megkülönböztetünk egy metabolikus túltermelő típust és egy extra-renális sérült kiválasztás típust, ahol főként az *ABCG2* diszfunkcióból fakadó bélben keresztüli húgysav kiválasztás sérül. *Kép forrása: Ichida és mtsai (200), módosítva.*

fehérje funkcióját a bélben jelentősen rontja, hajlamosít a köszvény kialakulására.

6.2.2 Egyéb *ABCG2* mutációk a kaukázusi populációban

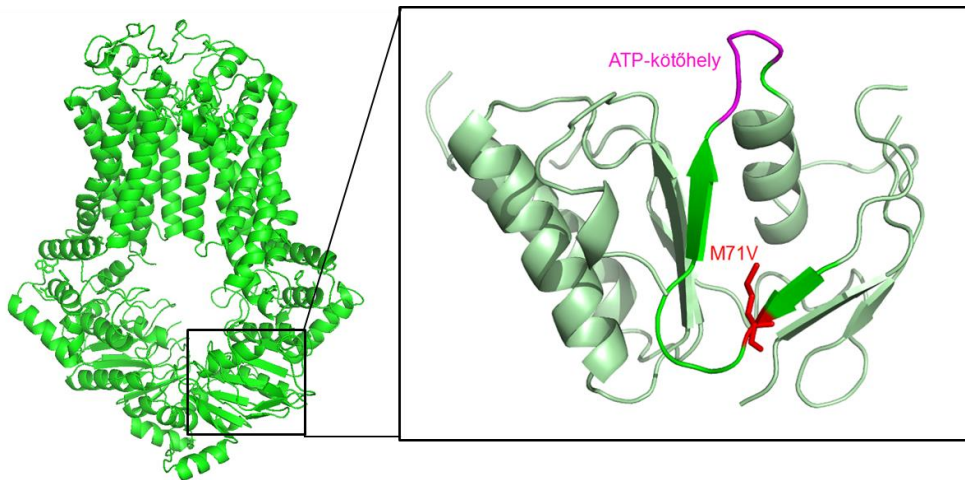
A Q141K variánson kívül egyéb, ritkább *ABCG2* mutációkról kiderült, hogy a köszvényben szerepet játszanak. Japánban a Q141K mellett a második leggyakoribb mutáció az R126X, mely csonka fehérjét eredményez és a köszvény kialakulásában szerepet játszik (201, 202). Hazánkban az *ABCG2* nonszensz és misszensz variánsai jóval ritkábbak, mint Kelet-Ázsiában (203). Az R126X pedig nem fordul elő egyáltalán, de több olyan variánst is azonosítottak, ami az európai populációban szerepet játszhat a köszvény kialakulásában (8. táblázat). Munkám során egy teljesen új módszerrel több olyan véradó donort találtam, akik alacsonyabb *ABCG2* expresszióval rendelkeztek. A módszer segítségével azonosítottam több defektív mutációt. Találtam három egyént, akik heterozigóta formában hordozták az R236X mutációt, mely a fehérje korai terminálódását és lebomlását okozza. Erről a mutációról már ismeretes volt, hogy a hazai populációban jelen van és a fehérjeszint jelentős csökkenését okozza (120). Találtam egy embert, aki az R383C variánst hordozza. Erről az aminosavról már korábban kiderült, hogy fontos a fehérje megfelelő érésében és foldjában (204), majd később kimutatták, hogy egy glutamáttal (E458) esszenciális kölcsönhatást alakít ki a fehérjén belül (205), habár ez az első alkalom, hogy humán mintákban is alátámasztották a fontosságát. Mindezek mellett pedig két (egy köszvényes és egy kontroll) egyénben találtam egy új, eddig nem karakterizált, M71V aminosavcserével (n.211A>G, rs148475733) járó mutációt. Ez a mutáció alacsonyabb szintet okozott a vörösvértesteken és a sejtvonalakon is a vad típushoz viszonyítva. A qPCR genotipizálás alapján megállapítottam, hogy ez a mutáció hazánkban viszonylag gyakori, csaknem minden századik ember hordozza heterozigóta formában.

8. táblázat: Az Európában idáig megtalált ABCG2 mutációk. MAF: minor allél frekvencia Európában jellemző értéke, zárójelben: a mi vizsgálataink alapján meghatározott MAF.

aminosav- csere	rs kód	MAF Európában	cikk
V12M	rs2231137	0,0606	Kasza (120)
M71V	rs148475733	0,0010 (0,0049)	Zámbó (206)
Q141K	rs2231142	0,0944 (0,0963)	Kasza/Zámbó/Stiburkova/Morisaki (120, 206, 207, 208)
R147W	rs372192400	n.m.	Stiburkova (207)
T153M	rs753759474	n.m.	Stiburkova (207)
R236X	rs140207606	0 (0,0037)	Kasza/Zámbó (120, 206)
L264HfsX14	rs387906870	n.m.	Kasza (120)
K360Δ	rs750972998	n.m.	Stiburkova (207)
F373C	rs752626614	n.m.	Stiburkova (207)
R383C	rs560659849	0,0010	Zámbó (206)
T434M	rs769734146	n.m.	Stiburkova (207)
S476P	rs1274428653	n.m	Stiburkova (207)
D620N	rs34783571	0,0040	Morisaki (208)

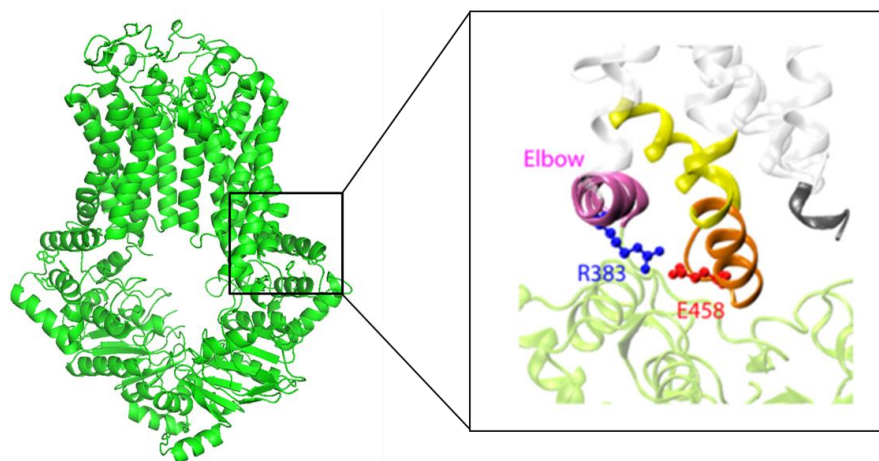
6.2.3 Az M71V és R383C ABCG2 mutációk szerkezeti hatása

Az 71. pozícióban lévő metionin az ABCG2 NBD régiójában található egy béta-redős struktúrában, nem messze az ATP-kötő helytől (30. ábra). A homológia modell alapján (209) a béta-redő mögött egy kiterjedt kavitás van, ami az M71V aminosavcsere hatására torzulhat. Az általunk elvégzett molekula dinamikai (MD) szimulációk is azt sugallják, hogy az aminosavcsere hatására az NBD mozgékonyága megváltozik, ezért az M71V variánssal rendelkező fehérje instabilabb lehet a vad típusnál.



30. ábra: Az M71 aminosav elhelyezkedése az ABCG2 szerkezetben az ABCG5/G8 homológia modell alapján. Az M71 a fehérje NBD-jén belül egy béta-redős struktúrában helyezkedik el, mely közel van az ATP-kötő régióhoz. Az M71V aminosavcsere hatására a fehérje instabilabb. (*László és mtsai (209) modell alapján, PyMOL*)

A 383. pozícióban lévő argininről már korábban leírták, hogy rendkívül fontos az ABCG2 biogenezésében; a megfelelő harmadlagos szerkezetének kialakításában, a membránba beágyazódásában és a transzportban is. Ez az arginin az NBD-k és TMD-k határán helyezkedik el, az ún. könyök vagy konnektor hélixben (31. ábra). A konnektor hélix felelős az ATP hasításából származó konformációs változások átadásához a TMD irányába. *Khunweerapong és mtsai (205)* leírták, hogy az ABCG5/G8 homológia modell alapján ez az arginin egy sóhídat képez a 458. pozícióban lévő glutamáttal, amely elengedhetetlen az erőátvitel és szubsztrát transzport szempontjából. Az arginin hiányában nagy valószínűséggel a fehérje inaktív és instabil.



31. ábra: Az R383 aminosav elhelyezkedése az ABCG2 szerkezetben az ABCG5/G8 homológia modell alapján. Az R383 az NBD és TMD-k közötti ún. konnektor hélixen található, mely az erőátvitel szempontjából fontos régiója a fehérjének. Az R383 egy sóhídat alakít ki a szemben lévő E458 aminosavval, a sóhíd hiányában a fehérje inaktív és instabil. (*Khunweeraopong és mtsai (205) alapján*)

6.2.4 Kis molekulák használata a sérült ABCG2 kiegészítésére

Az M71V aminosavcserét hordozó variánsról kimutattam, hogy transzportálja az ABCG2 egyik ismert szubsztrátját, a Hoechst 33342-öt. Azaz a fehérje funkcionálisan nem sérült, csak nem jut ki a membránba megfelelő mennyiségben. Korábbi kutatások során több ABC-típusú fehérje esetén is sikeresen alkalmaztak többféle kémiai chaperon molekulát, melyek stabilizálják a rosszul feltekeredett fehérjéket (210, 211). Ide sorolható a 4-fenilbutirát is (4-PBA), mely képes kiegészíteni a Q141K aminosavcserét hordozó ABCG2-öt a membránba (165). Emellett a hiszton-deacetiláz inhibitorok (HDI-k) is alkalmasak a fehérje stabilitásán növelni, ugyanis amellett, hogy a hiszton-deacetilázok (HDAC) a hisztonokon működnek, képesek a sejten belüli transzportban résztvevő fehérjéket is deacetilálni, így a HDI-k az újonnan készült fehérjét stabilizálni tudják és az aggregátumba jutását megakadályozzák. ABC-transzporterek esetén a fehérje szubsztrátja is képes lehet a fehérje szerkezetét stabilizálni. ABCG2 esetén a mitoxantron kezelés növelte a fehérje szintjét a membránban (165). Szintén sikerült a variánst hordozó fehérjét a membránban stabilizálni kolhicinnel, mely egy mikrotubulus polimerizációt gátló szer, és valószínűleg a fehérje aggregátumba történő retrográd

transzportját akadályozza meg. Emellett a köszvény kezelésére is széles körben használják, elsősorban a fehérvérsejteken kifejtett hatása miatt (172). Sejtvonalakon sikerült szignifikánsan megnövelnem az vad típusú fehérje szintjét 4-PBA kezeléssel. Bár a mutáns verziók esetén csak kis mértékű fehérjeszint-emelkedést figyeltem meg a kezelés hatására. A kolhicin kezelés pedig mind a vad típusú, mind a mutáns verziójú fehérjék szintjét szignifikánsan megemelte a membránban. Ezek a molekulák, de kiváltképp a kolhicin tehát a későbbiekben alkalmas lehet az ABCG-hez köthető, extra-renális típusú köszvény gyógyítására.

7. KÖVETKEZTETÉSEK:

7.1 A vörösvértest expressziós mérések alkalmasak eddig nem azonosított variánsok megtalálására

A vörösvértest expressziós mérések során csupán egy csepp vérből a levételt követő három órán belül akár 10-20 membránfehérje szintjét meg tudjuk állapítani. Munkám során az általunk kifejlesztett módszert a hazai populációban jellemző, expressziós szintet érintő variánsok azonosítására használtam két fehérje, a PMCA4b kalcium exporter és az ABCG2 endo- és xenobiotikum transzporter esetén.

- A PMCA4b esetén találtam egy eritroid specifikus enhanszerben elhelyezkedő haplotípust, melynek protektív hatása van malária esetén GWA tanulmányok alapján.
- Az ABCG2 génben több defektív mutációt azonosítottam. Az R236X a fehérje korai terminálódását és lebomlását okozza. Az R383C egy fontos sóhíd megszűnését okozza, mely következtében a fehérje inaktív és instabil. Ezek mellett egy új, eddig nem ismert variánst is azonosítottam, az M71V-t, mely a hazai populációban viszonylag gyakori.

7.2 A vörösvértest expressziós mérések prognosztikai vagy diagnosztikai szempontból is hasznosak lehetnek

- PMCA4b esetén az azonosított haplotípus szoros korrelációban volt a vörösvértest expressziós értékekkel, azaz a haplotípus kimutatására alkalmas lehet ez a módszer.
- Az ABCG2-ben több olyan variáns előfordul, mely a fehérje szintjét vagy aktivitását befolyásolja. A GWA tanulmányok alapján az ABCG2 egyéb szabályozó régióiban előforduló, például intronikus vagy promóter SNP-k is szerepet játszhatnak a köszvényben, tehát valahogyan az ABCG2 aktivitását vagy expresszióját befolyásolhatják. A vörösvértest expressziós mérések során is találtunk olyan önkéntes donorokat, akik alacsonyabb ABCG2 szinttel rendelkeznek, de az exon szekvenálás során nem sikerült feltárni a háttérben húzódó variánst vagy egyéb regulációs módosulásokat. Ezért a vörösvértest alapú membránszint meghatározás kifejezetten előnyös lehet ennek a fehérjének a klinikai vizsgálata során.

Tehát az általunk beállított vörösvértest szinteket célzó mérések – az új variánsok azonosítása mellett - alkalmasak lehetnek a membránfehérjék direkt kvantitatív meghatározására prognosztikai vagy diagnosztikai célokból. A szakirodalomban nem találtam más hasonló módszert, mely egy csepp vérből képes lenne több membránfehérje szintjét párhuzamosan, gyorsan és egyszerűen meghatározni. A legtöbb molekuláris diagnosztikai labor felszerelt áramlási citométerrel, így a módszer alkalmas lehet a jövőben a klinikus partnerek segítésére is.

7.3 A vörösvértest expressziós mérések limitációi

- A vörösvértesteken több mint 300 membránfehérje megtalálható a legújabb tömegspektrometriás adatok alapján. Viszont lehetnek olyan fehérjék, melyek ezeken a sejteken nem expresszálódnak, így ezekben az esetekben a módszer nem alkalmas a fehérjeszint mérésekre.
- A membránfehérjék jelölésére jó antitestekkel kell rendelkezünk. Az általunk kipróbált 40 fehérjét célzó antitestből összesen 35 tudta egyáltalán detektálni a fehérjét, és ezek közül is csak 11 adott a kvantitatív mérés szempontjából megfelelő jelet.

7.4 A PMCA4b-t érintő haplotípus jelentősége

A PMCA4b fehérjét kódoló *ATP2B4* génben azonosítottam egy haplotípust, mely:

- a vörösvértesteken heterozigóta formában körülbelül 75%-os, homozigóta formában körülbelül 50%-os fehérjeexpressziót eredményez. A többi PMCA izoforma és variáns nem érintett.
- körülbelül 0,1 minor allél frekvenciával rendelkezik Magyarországon, de a malária endemikus területeken ennél jóval gyakoribb.
- befolyásolja a vörösvértestek kalcium exportját, mivel ez a vörösvértestek fő kalcium exporter fehérjéje.

- egy eritroid specifikus enhanszerben van, mely az eritroid sejtvonalakban irányítja a fehérje expresszióját. Más típusú sejtekben valószínűleg nincs hatással az expresszióra.

7.5 Az *ABCG2*-ben azonosított SNP-k, mutációk jelentősége

Köszvényes betegeket és egészséges kontrollokat vizsgálva megállapítottam, hogy:

- a köszvényes betegek vörösvértestjein az *ABCG2* szintje alacsonyabb.
- a köszvényes emberekben gyakrabban fordul elő az *ABCG2* gyakori, Q141K aminosavcserét okozó variánsa. Ez a variáns csökkent expressziót okoz a vörösvértesteken is.

Emellett több embert találtam, akik közel 50%-os expresszióval rendelkeztek. Ezekben az emberekben három ritka mutációt azonosítottam:

- az R236X a fehérje korai terminálódását és lebomlását okozza.
- az R383C aminosavcsere a fehérje egyik kritikus sóhídját teszi tönkre, így a fehérje nem működik és instabil.
- az M71V-t ez idáig nem azonosították. Egyszerű sejtes módszerekkel alátámasztottam, hogy az M71V aktív, csak instabil és lebomlik. sikertelen kolhicin kezelés segítségével korrigálnom.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emberi vörösvértesteken több mint 300 membránfehérje megtalálható. Kifejlesztettünk egy olyan módszert, melynek segítségével ezeket a membránfehérjéket kvantitatívan mérni tudjuk áramlási citométer segítségével. A mérések során két fehérje – a PMCA4b és ABCG2 - esetén is kiugró értékeket találtunk egyes véradó önkéntesek esetén.

A PMCA4b fehérje a vörösvértestek fő kalcium-ion exporter fehérjéje. A genetikai analízissel egy haplotípust azonosítottam, mely a fehérje csökkent expresszióját okozza vörösvértesteken. A gén egyik eritroid specifikus enhanszerében van. Korábbi tanulmányok alapján a haplotípus védettséget biztosít maláriával szemben, bár a pontos molekuláris mechanizmus még nem ismert ezzel kapcsolatosan.

Az ABCG2 egy fontos xeno- és endobiotikum transzporter. Szubsztrátjai közé tartozik a húgysav is, ezért fontos szerepe van a köszvény kialakulásában. A legújabb nézetek szerint egy külön fiziológiai kórképnek kell tekinteni az ABCG2 diszfunkcióval rendelkező köszvényes betegeket, ugyanis nekik a bélén keresztüli kiválasztásuk sérült, míg a vese kiválasztása megfelelő. Köszvényes és kontroll betegeket megvizsgálva megerősítettük, hogy az ABCG2 egyik gyakori variánsának, a Q141K-nak szerepe van a köszvényben. A Q141K homozigóták körülbelül fele akkora ABCG2 vörösvértest expresszióval rendelkeznek. Emellett több olyan önkéntes véradót találtunk, akik nem Q141K homozigóták, de mégis fele akkora ABCG2 expresszióval rendelkeztek. A genetikai analízis során három mutációt azonosítottuk, köztük egy teljesen újat, az M71V-t. Nagyobb csoportot megvizsgálva megállapítottuk, hogy hazánkban csaknem minden 100. ember hordozhatja ezt a mutációt heterozigóta formában. Egyszerű sejtes mérésekkel igazoltam, hogy a fehérje aktív, csak nem jut ki a membránba. Kolhicinnel sikerült a sérült ABCG2-öt kisegítenem a membránba. A kolhicint eddig is használták a gyulladásos roham csökkentésére köszvényes betegekben, de a vizsgálataink rámutattak arra, hogy talán az ABCG2-ön kifejtett hatása is hozzájárulhat a köszvényben mutatott hatásosságához a vegyületnek.

Az eredmények arra utalnak, hogy az általunk kifejlesztett vörösvértest alapú membránfehérje mérések segíthetnek az új variánsok azonosításában, de a technika emellett a gyógyászatban, a klinikai partnerek segítésére is alkalmas lehet a jövőben.

9. SUMMARY

Human red blood cells (RBCs) harbor more than 300 membrane proteins. We have developed a method for quantitatively measuring these membrane proteins using flow cytometry. During these measurements, we found differences in the red blood cell expression for two of the proteins, PMCA4b and ABCG2, in some volunteers.

PMCA4b is the major calcium ion exporter protein of the red blood cells. By genetic analysis, I identified a haplotype that causes decreased protein expression in RBCs. This haplotype is located in an erythroid specific enhancer of the gene. Based on previous studies, the haplotype provides some degree of protection against malaria, although the exact molecular mechanism is not yet known in this regard.

ABCG2 is an important xeno- and endobiotic transporter. One of the ABCG2 substrates is uric acid; therefore this protein plays an important role in the development of gout. According to the recent data, gout patients with ABCG2 dysfunction are considered to belong to a separate pathophysiological type of gout because the intestinal urate secretion is impaired while the kidney urate secretion is appropriate. By examining gout patients and healthy control individuals, we confirmed that a common variant of ABCG2, Q141K, has a role in gout. Q141K homozygotes have about 50% expression of ABCG2 in their red blood cells. In addition, we found several blood donors who were not Q141K homozygotes, but still had only 50% of the normal ABCG2 expression. With genetic analysis I identified three relevant ABCG2 mutations, including a new one, M71V. Testing a larger healthy group of 405 people, we found that almost 1 percent of the people in our country carry this mutation in a heterozygous form. By cellular transport measurements, I showed that the M71V ABCG2 protein is active but does not reach the cell membrane. By the addition of colchicine I observed the appearance of the mutant ABCG2 in the membrane. Colchicine has been used to reduce the inflammation in gout patients, but our studies have shown that its positive effect in gout may also be partially due to its action increasing the plasma membrane expression of ABCG2.

These results suggest that our red blood cell-based membrane protein measurements can help to identify new variants in membrane proteins, while the method may also be useful in the field of medical diagnostics and may help clinical treatments in the future.

10. IRODALOMJEGYZÉK:

1. Domene BC, Bond PJ, Sansom MSP. (2003) Membrane protein simulations: ion channels and bacterial outer membrane proteins. *Adv. Protein Chem.*, 66:159–193.
2. Liu J, Rost B. (2008) Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Sci.*, 10(10):1970–1979.
3. Schulz GE. (2002) The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1565(2):308–317.
4. Terstappen GC, Reggiani A. (2001) In silico research in drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22(1):23–26.
5. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Ion channels. *In: Br. J. Pharmacol.* 2011;164(S1):137–174.
6. Nicholls DG, Ferguson SJ. Transporters. *In: Bioenergetics.* 2013:221–251
7. Kellett GL, Brot-Laroche E. (2005) Apical GLUT2: A major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*, 54(10):3056–3062.
8. Pedersen PL. (2007) Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 39(5–6):349–355.
9. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Cotransport by symporters and antiporters. *In: Freeman W ed. Molecular Cell Biology.* New York: 2000:Section 15.6
10. Várady G, Cserepes J, Németh A, Szabó E, Sarkadi B. (2013) Cell surface membrane proteins as personalized biomarkers: where we stand and where we are headed. *Biomark. Med.*, 7(5):803–819.
11. Pasini EM, Lutz HU, Mann M, Thomas AW. (2010) Red blood cell (RBC) membrane proteomics - Part I: Proteomics and RBC physiology. *J. Proteomics*, 73(3):403–420.

12. Mercer RW, Schneider JW, Benz EJ. Na,K-ATPase structure. *In: Agre P, Parker JC eds. Red blood cell membranes: structure. Function. Clinical implications.* 1989:135–165
13. Radosinska J, Vrbjar N. (2016) The role of red blood cell deformability and Na,K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Physiol. Res.*, 65(S1):S43–S54.
14. Larsen FL, Katz S, Roufogalis BD, Brooks DE. (1981) Physiological shear stresses enhance the Ca^{2+} permeability of human erythrocytes. *Nature*, 294(5842):667–668.
15. Lew VL, Tiffert T, Etzion Z, Perdomo D, Daw N, Macdonald L, Bookchin RM. (2005) Distribution of dehydration rates generated by maximal Gardos-channel activation in normal and sickle red blood cells. *Blood*, 105(1):361–367.
16. Lew VL, Daw N, Etzion Z, Tiffert T, Muoma A, Vanagas L, Bookchin RM. (2007) Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. *Blood*, 110(4):1334–1342.
17. Lew VL, Tiffert T. (2017) On the mechanism of human red blood cell longevity: Roles of calcium, the sodium pump, PIEZO1, and gardos channels. *Front. Physiol.*, 8:1–7.
18. Carafoli E, Brini M. (2000) Calcium pumps: Structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4(2):152–161.
19. Strehler EE. The ATP2B Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase family: Regulation in response changing demands of cellular calcium transport. *In: Regulation of Ca^{2+} -ATPases, V-ATPases and F-ATPases.* 2016:63–79
20. Strehler EE, Filoteo a G, Penniston JT, Caride AJ. (2007) Plasma-membrane Ca^{2+} pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soccity Trans.*, 35(5):919–922.
21. Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE. (2004) Targeted

ablation of Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.*, 279(32):33742–33750.

22. Prasad V, Okunade GW, Miller ML, Shull GE. (2004) Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322(4):1192–1203.

23. Afroze T, Husain M. (2000) c-Myb-binding sites mediate G1/S-associated repression of the Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase-1 promoter. *J. Biol. Chem.*, 275(12):9062–9069.

24. Cai Q, Chandler JS, Wasserman RH, Kumar R, Penniston JT. (1993) Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(4):1345–9.

25. Glendenning P, Ratajczak T, Dick IM, Prince RL. (2000) Calcitriol upregulates expression and activity of the 1b isoform of the Plasma Membrane Calcium Pump in immortalized distal kidney tubular cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 380(1):126–132.

26. Glendenning P, Ratajczak T, Dick IM, Prince RL. (2009) Regulation of the 1b isoform of the Plasma Membrane Calcium Pump by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.*, 16(3):525–534.

27. Zelinski JM, Sykes DE, Weiser MM. (1991) The effect of vitamin D on rat intestinal plasma membrane Ca-pump mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179(2):749–755.

28. Habib T, Park H, Tsang M, de Alborán IM, Nicks A, Wilson L, Knoepfler PS, Andrews S, Rawlings DJ, Eisenman RN, Iritani BM. (2007) Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J. Cell Biol.*, 179(4):717–731.

29. Silverstein RS, Tempel BL. (2006) Atp2b2, encoding plasma membrane Ca^{2+} -ATPase type 2, (PMCA2) exhibits tissue-specific first exon usage in hair cells, neurons, and mammary glands of mice. *Neuroscience*, 141(1):245–257.

30. Minich RR, Li J, Tempel BL. (2017) Early growth response protein 1 regulates promoter activity of α -plasma membrane calcium ATPase 2, a major calcium pump in the brain and auditory system. *BMC Mol. Biol.*, 18(1):14.
31. Toyoshima C, Mizutani T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430:529.
32. Sweadner KJ, Donnet C. (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 356(3):685–704.
33. Lervik A, Bresme F, Kjelstrup S. (2012) Molecular dynamics simulations of the Ca^{2+} -pump: A structural analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14(10):3543–3553.
34. Enyedi A, Vorherr T, James P, McCormick DJ, Filoteo AG, Carafoli E, Penniston JT. (1989) The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *J. Biol. Chem.*, 264(21):12313–12321.
35. Padányi R, Pászty K, Hegedűs L, Varga K, Papp B, Penniston JT, Enyedi Á. (2016) Multifaceted plasma membrane Ca^{2+} pumps: From structure to intracellular Ca^{2+} handling and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863(6, Part B):1351–1363.
36. Pászty K, Verma AK, Padányi R, Filoteo AG, Penniston JT, Enyedi Á. (2002) Plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 4b Is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 277(9):6822–6829.
37. Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P. (2002) Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.*, 9(8):818.
38. Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vrolix M, de Smedt H, Casteels R. (1989) Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem. J.*, 263(3):687–694.
39. Penniston JT, Enyedi A. (1998) Modulation of the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump .

J. Membr. Biol., 165(2):101–109.

40. Enyedi A, Verma AK, Filoteo AG, Penniston JT. (1996) Protein kinase C activates the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 271(50):32461–32467.

41. Enyedi A, Elwess NL, Filoteo AG, Verma AK, Paszty K, Penniston JT. (1997) Protein kinase C phosphorylates the “a” forms of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 272(44):27525–27528.

42. Antalffy G, Pászty K, Varga K, Hegedűs L, Enyedi Á, Padányi R. (2013) A C-terminal di-leucine motif controls plasma membrane expression of PMCA4b. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833(12):2561–2572.

43. DeMarco SJ, Strehler EE. (2001) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.*, 276(24):21594–21600.

44. Brodin P, Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E. (2018) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. *Eur. J. Biochem.*, 204(2):939–946.

45. Schatzmann HJ, Rossi JL. (1971) ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-activated membrane ATPases in human red cells and their possible relations to cation transport. *Biochim.*, 75659(241):379–392.

46. Wolf HU. (1972) Studies on a Ca^{2+} -dependent ATPase of human erythrocyte membranes: Effects of Ca^{2+} and H^{+} . *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 266(2):361–375.

47. Sarkadi B. (1980) Active calcium transport in human red cells. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.*, 604:159–190.

48. Strehler EE. (1991) Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca^{2+} pumps. *J. Membr. Biol.*, 120(1):1–15.

49. Schatzmann HJ. Active calcium transport and Ca^{2+} -activated ATPase in human red cells. In: *Current Topics in Membranes and Transport*. Academic Press; 1975:125–168
50. Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E. (1987) The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J. Biol. Chem.*, 262(13):6425–6430.
51. Caride AJ, Filoteo AG, Enyedi A, Verma AK, Penniston JT. (1996) Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies. *Biochem. J.*, 316(1):353–359.
52. Borke JL, Minami J, Verma A, Penniston JT, Kumar R. (1987) Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane Ca^{++} - Mg^{++} adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. *J. Clin. Invest.*, 80(5):1225–1231.
53. Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L. (2013) Calcium in red blood cells — a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(5).
54. Tiffert T, Bookchin RM, Lew VL. Calcium homeostasis in normal and abnormal human red cells. In: Bernhardt I, Ellory JC eds. *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003:373–405
55. Hertz L, Huisjes R, Llaudet-Planas E, Petkova-Kirova P, Makhro A, Danielczok JG, Egee S, del Mar Mañú-Pereira M, van Wijk R, Vives Corrons JL, Bogdanova A, Kaestner L. (2017) Is increased intracellular calcium in red blood cells a common component in the molecular mechanism causing anemia? *Front. Physiol.*, 8:673.
56. Schmitz G, Langmann T. Human ABC Transporters: Function, Expression, and Regulation. In: Ferscht A ed. *Protein Science Encyclopedia*. Online, 2008.
57. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. (2009) Human ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Family. *Hum. Genomics*, 3(3):281–90.
58. Higgins CF. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.*, 152(3):205–210.

59. Theodoulou FL, Kerr ID. (2015) ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem. Soc. Trans.*, 43(5):1033–1040.
60. Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CUT, Pestova TV. (2010) The Role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell*, 37(2):196–210.
61. Tyzack JK, Wang X, Belsham GJ, Proud CG. (2000) ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 275(44):34131–34139.
62. Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). *Drug Discov. Today*, 13(9):379–393.
63. Hollenstein K, Dawson RJP, Locher KP. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17(4):412–418.
64. Dassa E. (2011) Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays Biochem.*, 50:19–42.
65. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE. (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.*, 113(11):2011–2021.
66. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J. Biol. Chem.*, 278:48275–48282.
67. Saurin W, Hofnung M, Dassa E. (1999) Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.*, 48(1):22–41.
68. Albrecht C, Viturro E. (2007) The ABCA subfamily — gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 453(5):581–589.

69. Dean M, Hamon Y, Chimini G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.*, 42(7):1007–1017.
70. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol. Rev.*, 86(4):1179–1236.
71. Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T. (1992) Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89(9):3932–3936.
72. Feng M, Yin B, Shen T, Ma Q, Liu L, Zheng J, Zhao Y, Qian K, Liu D. (2009) TAP1 and TAP2 polymorphisms associated with ankylosing spondylitis in genetically homogenous Chinese Han population. *Hum. Immunol.*, 70(4):257–261.
73. Fraile A, Collado MD, Matarán L, Martín J, Nieto A. (2000) TAP1 and TAP2 polymorphism in spanish patients with ankylosing spondylitis. *Exp. Clin. Immunogenet.*, 17(4):199–204.
74. Bonin S, Pascolo L, Crocé LS, Stanta G, Tiribelli C. (2002) Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. *Mol. Med.*, 8(6):318–325.
75. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.*, 20:233.
76. Loe DW, Deeley RG, Cole SPC. (1996) Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur. J. Cancer*, 32(6):945–957.
77. Krishnamachary N, Center MS. (1993) The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.*, 53(16):3658–3661.
78. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of

ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, 2:48.

79. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE.(1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63(4):827–834.

80. Chen TY, Hwang TC. (2008) CLC-0 and CFTR: Chloride Channels Evolved From Transporters. *Physiol. Rev.*, 88(2):351–387.

81. Lubinsky M. (2012) Hypothesis: Cystic fibrosis carrier geography reflects interactions of tuberculosis and hypertension with vitamin D deficiency, altitude and temperature. Vitamin D deficiency effects and cf carrier advantage. *J. Cyst. Fibros.*, 11(1):68–70.

82. Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*, 266(5182):107-109.

83. Jansen RS, Küçükosmanoğlu A, de Haas M, Sapth S, Otero JA, Hegman IEM, Bergen AAB, Gorgels TGMF, Borst P, van de Wetering K. (2013) ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(50):20206-20211.

84. Iliás A, Urbán Z, Seidl TL, Le Saux O, Sinkó E, Boyd CD, Sarkadi B, Váradi A. (2002) Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J. Biol. Chem.*, 277(19):16860–16867.

85. Pomozi V, Brampton C, van de Wetering K, Zoll J, Calio B, Pham K, Owens JB, Marh J, Moisyadi S, Váradi A, Martin L, Bauer C, Erdmann J, Aherrahrou Z, Le Saux O. (2017) Pyrophosphate supplementation prevents chronic and acute calcification in ABCC6-deficient mice. *Am. J. Pathol.*, 187(6):1258–1272.

86. Dedinszki D, Szeri F, Kozák E, Pomozi V, Tőkési N, Mezei TR, Merczel K, Letavernier E, Tang E, Le Saux O, Arányi T, van de Wetering K, Váradi A. (2017) Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol. Med.*, 9(11):1463-1470

87. Materna V, Lage H. (2003) Homozygous mutation Arg768Trp in the ABC-transporter encoding gene MRP2/cMOAT/ABCC2 causes Dubin-Johnson syndrome in a Caucasian patient. *J. Hum. Genet.*, 48(9):484–486.
88. Reis AF, Ye WZ, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. (2000) Association of a variant in exon 31 of the sulfonylurea receptor 1 (SUR1) gene with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *Hum. Genet.*, 107(2):138–144.
89. Laukkanen O, Pihlajamäki J, Lindström J, Eriksson J, Valle TV, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M. (2004) Polymorphisms of the SUR1 (ABCC8) and Kir6.2 (KCNJ11) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to Type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89(12):6286–6290.
90. Bergen AAB, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PTVM. (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.*, 25:228–231.
91. Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J. (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*, 268(5209):426–429.
92. Harakalova M, van Harssel JJT, Terhal PA, van Lieshout S, Duran K, Renkens I, Amor DJ, Wilson LC, Kirk EP, Turner CLS, Shears D, Garcia-Minaur S, Lees MM, Ross A, Venselaar H, Vriend G, Takanari H, Rook MB, van der Heyden MAG, Asselbergs FW, Breur HM, Swinkels ME, Scurr IJ, Smithson SF, Knoers NV, van der Smagt JJ, Nijman IJ, Kloosterman WP, van Haelst MM, van Haaften G, Cuppen E. (2012) Dominant missense mutations in ABCC9 cause Cantú syndrome. *Nat. Genet.*, 44:793.
93. Srinivasan S, Bingham JL, Johnson D. (2009) The ABCs of human alternative splicing: a review of ATP-binding cassette transporter splicing. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 12(1):149–58.
94. Hlaváč V, Souček P. (2015) Role of family D ATP-binding cassette transporters (ABCD) in cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, 43(5):937–942.

95. Baker A, Carrier DJ, Schaedler T, Waterham HR, van Roermund CW, Theodoulou FL. (2015) Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism. *Biochem. Soc. Trans.*, 43(5):959–965.
96. Pujol A, Ferrer I, Camps C, Metzger E, Hindelang C, Callizot N, Ruiz M, Pàmols T, Giròs M, Mandel JL. (2004) Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 13(23):2997–3006.
97. Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P, Tsuji S. (2011) Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*, 12(1):41–50.
98. Gärtner J, Moser H, Valle D. (1992) Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat. Genet.*, 1:16.
99. Kusuhara H, Sugiyama Y. (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 453(5):735–744.
100. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán Á, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.*, 1(2):121–131.
101. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.*, 5(1):21–53.
102. Phipps-Green AJ, Hollis-Moffatt JE, Dalbeth N, Merriman ME, Topless R, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PBB, Stamp LK, Merriman TR. (2010) A strong role for the ABCG2 gene in susceptibility to gout in New Zealand Pacific Island and Caucasian, but not Māori, case and control sample sets. *Hum. Mol. Genet.*, 19(24):4813–4819.
103. Merriman TR, Dalbeth N. (2011) The genetic basis of hyperuricaemia and gout. *Jt.*

Bone Spine, 78(1):35–40.

104. Kannangara DRW, Phipps-Green AJ, Dalbeth N, Stamp LK, Williams KM, Graham GG, Day RO, Merriman TR. (2016) Hyperuricaemia: Contributions of urate transporter ABCG2 and the fractional renal clearance of urate. *Ann. Rheum. Dis.*, 75(7):1363-1366
105. Yamagishi K, Tanigawa T, Kitamura A, Köttgen A, Folsom AR, Iso H. (2010) The rs2231142 variant of the ABCG2 gene is associated with uric acid levels and gout among Japanese people. *Rheumatology*, 49(8):1461–1465.
106. Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. (2009) Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(1):26–33.
107. Keskitalo JE, Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M. (2009) Different effects of the ABCG2 c.421C>A SNP on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin and simvastatin. *Pharmacogenomics*, 10(10):1617–1624.
108. Hu M, To KKW, Mak VWL, Tomlinson B. (2011) The ABCG2 transporter and its relations with the pharmacokinetics, drug interaction and lipid-lowering effects of statins. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 7(1):49–62.
109. Mickley L, Jain P, Miyake K, Schriml LM, Rao K, Fojo T, Bates S, Dean M. (2001) An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain. *Mamm. Genome*, 12(1):86–88.
110. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. (2001) Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum. Mutat.*, 18(4):359–360.
111. Park JE, Ryoo G, Lee W. (2017) Alternative splicing: expanding diversity in major ABC and SLC drug transporters. *AAPS J.*, 19(6):1643–1655.
112. Zong Y, Zhou S, Fatima S, Sorrentino BP. (2006) Expression of mouse Abcg2 mRNA during hematopoiesis is regulated by alternative use of multiple leader exons

and promoters. *J. Biol. Chem.*, 281(40):29625–29632.

113. Sándor S, Jordanidisz T, Schamberger A, Várady G, Erdei Z, Apáti Á, Sarkadi B, Orbán T. (2016) Functional characterization of the ABCG2 5' non-coding exon variants: Stem cell specificity, translation efficiency and the influence of drug selection. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, 1859(7):943–951.

114. Poonkuzhali B, Lamba J, Strom S, Sparreboom S, Thummel K, Watkins P, Schuetz E. (2008) Association of breast cancer resistance protein/ABCG2 phenotypes and novel promoter and intron 1 single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.*, 36(4):780–795.

115. Kenneth WKT, Zhan Z, Litman T, Bates SE. (2008) Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line. *Mol. Cell. Biol.*, 28(17):5147–5161.

116. Ripperger A, Benndorf RA. (2016) The C421A (Q141K) polymorphism enhances the 3'-untranslated region (3'-UTR)-dependent regulation of ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Biochem. Pharmacol.*, 104:139–147.

117. Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD. (2001) Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, 1520(3):234–241.

118. Hegedüs T, Chaubey PM, Várady G, Szabó E, Sarankó H, Hofstetter L, Roschitzki B, Stieger B, Sarkadi B. (2015) Inconsistencies in the red blood cell membrane proteome analysis: generation of a database for research and diagnostic applications. *Database*, 2015:bav056.

119. Gyimesi G, Borsodi D, Sarankó H, Tordai H, Sarkadi B, Hegedüs T. (2012) ABCMdb: A database for the comparative analysis of protein mutations in ABC transporters, and a potential framework for a general application. *Hum. Mutat.*, 33(11):1547–1556.

120. Kasza I, Várady G, Andrikovics H, Koszarska M, Tordai A, Scheffer GL, Németh A, Szakács G, Sarkadi B. (2012) Expression levels of the ABCG2 multidrug transporter in human erythrocytes correspond to pharmacologically relevant genetic variations. *PLoS One*, 7(11):1–8.
121. Koszarska M, Kucsma N, Kiss K, Varady G, Gera M, Antalffy G, Andrikovics H, Tordai A, Studzian M, Strapagiel D, Pulaski L, Tani Y, Sarkadi B, Szakacs G. (2014) Screening the expression of ABCB6 in erythrocytes reveals an unexpectedly high frequency of Lan mutations in healthy individuals. *PLoS One*, 9(10):e111590.
122. Helias V, Saison C, Ballif BA, Peyrard T, Takahashi J, Takahashi H, Tanaka M, Deybach JC, Puy H, Le Gall M, Sureau C, Pham BN, Le Pennec PY, Tani Y, Cartron JP, Arnaud L. (2012) ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. *Nat. Genet.*, 44:170.
123. Saison C, Helias V, Ballif BA, Peyrard T, Puy H, Miyazaki T, Perrot S, Vayssier-Taussat M, Waldner M, Le Pennec PY, Cartron JP, Arnaud L. (2012) Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nat. Genet.*, 44(2):174–177.
124. Pan D, Kalfa TA, Wang D, Risinger M, Crable S, Ottlinger A, Chandra S, Mount DB, Hubner CA, Franco RS, Joiner CH. (2011) KCL cotransporter gene expression during human and murine erythroid differentiation. *J. Biol. Chem.*, 286(35):30492–30503.
125. Steck TL. (1978) The band 3 protein of the human red cell membrane: A review. *J. Supramol. Struct.*, 8(3):311–324.
126. Fujinaga J, Tang XB, Casey JR. (1999) Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1. *J. Biol. Chem.*, 274(10):6626–6633.
127. Tanner MJA. (1997) The structure and function of band 3 (AE1): Recent developments (Review). *Mol. Membr. Biol.*, 14(4):155–165.
128. Vince JW, Reithmeier RAF. (1998) Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human Band 3, the erythrocyte Cl[−]/HCO₃[−] exchanger. *J. Biol. Chem.*,

273(43):28430–28437.

129. Branton D, Cohen CM, Tyler J. (1981) Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*, 24(1):24–32.

130. Sen AK, Widdas WF. (1962) Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit. *J. Physiol.*, 160(3):392–403.

131. Liu K, Agre P. Aquaporin Water Channels. *In: Encycl. Biol. Chem. Second Ed.* 2013;120–126.

132. Roudier N, Verbavatz JM, Maurel C, Ripoché P, Tacnet F. (1998) Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 273(14):8407–8412.

133. Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A. (2015) Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife*, 4:1–12.

134. Bae C, Gnanasambandam R, Nicolai C, Sachs F, Gottlieb PA. (2003) Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(12):E1162-8.

135. Lew VL, Tiffert T. (2017) On the mechanism of human red blood cell longevity: roles of calcium, the sodium pump, PIEZO1, and Gardos channels. *Front. Physiol.*, 8:977.

136. Ma S, Cahalan S, LaMonte G, Grubaugh ND, Zeng W, Murthy SE, Paytas E, Gamini R, Lukacs V, Whitwam T, Loud M, Lohia R, Berry L, Khan SM, Janse CJ, Bandell M, Schmedt C, Wengelnik K, Su AI, Honore E, Winzeler EA, Andersen KG, Patapoutian A. (2018) Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell*, 173(2):443–455.e12.

137. Gardos G. (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 30(3):653–4.

138. Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A. (2003) The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca^{2+} -activated K^{+} channel (Gardos channel) in human

red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(12):7366-7371.

139. Maher AD, Kuchel PW. (2003) The Gárdos channel: a review of the Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35(8):1182–1197.

140. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM. (2003) Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human erythrocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Physiol.*, 285(6):1553–1560.

141. Danielczok JG, Terriac E, Hertz L, Petkova-Kirova P, Lautenschläger F, Laschke MW, Kaestner L. (2017) Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient Ca^{2+} -mediated adaptations. *Front. Physiol.*, 8:979.

142. Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, Nehrke K, Brugnara C, Alper SL, Melvin JE. (2004) Physiological roles of the intermediate conductance, Ca^{2+} -activated potassium channel Kcnn4. *J. Biol. Chem.*, 279(46):47681–7.

143. Lew VL, Bookchin RM. (2005) Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol. Rev.*, 85(1):179–200.

144. Etzion Z, Tiffert T, Bookchin RM, Lew VL. (1993) Effects of deoxygenation on active and passive Ca^{2+} transport and on the cytoplasmic Ca^{2+} levels of sickle cell anemia red cells. *J. Clin. Invest.*, 92(5):2489–2498.

145. Lew VL, Ortiz OE, Bookchin RM. (1997) Stochastic nature and red cell population distribution of the sickling-induced Ca^{2+} permeability. *J. Clin. Invest.*, 99(11):2727–2735.

146. Yawata Y. Cell membrane: the red blood cell as a model. In: *Weinheim: Wiley-VCH*. 2003.

147. Abu-Hamdah R, Cho WJ, Cho SJ, Jeremic A, Kelly M, Ilie AE, Jena BP. (2013) Regulation of the water channel aquaporin-1: isolation and reconstitution of the regulatory complex. *Cell Biol. Int.*, 28(1):7–17.

148. Sarkadi B, Varady G, Kasza I. Quantitative biomarkers in the erythrocyte membrane.. *Google Pat.* 2013;EP2839293A2.

149. Tyan YC, Jong SB, Liao JD, Liao PC, Yang MH, Liu CY, Klauser R, Himmelhaus M, Grunze M. (2005) Proteomic profiling of erythrocyte proteins by proteolytic digestion chip and identification using two-dimensional electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 4(3):748–757.
150. Várady G, Szabó E, Fehér Á, Németh A, Zámbo B, Pákási M, Janka Z, Sarkadi B. (2015) Alterations of membrane protein expression in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.*, 1(3):334–338.
151. Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Furukawa T, Nakagawa H, Ishikawa T. (2009) Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: Ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(1):66–72.
152. Fölsch H. (2008) Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20(2):208–213.
153. Johannes L, Popoff V. (2008) Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell*, 135(7):1175–1187.
154. Hicke L, Dunn R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19(1):141–172.
155. Mitchell PJ, Tjian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 245(4916):371–378.
156. Masvidal L, Igreja S, Ramos MD, Alvarez A, de Gracia J, Ramalho A, Amaral MD, Larriba S, Casals T. (2013) Assessing the residual CFTR gene expression in human nasal epithelium cells bearing CFTR splicing mutations causing cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.*, 22:784.
157. Sonenberg N, Hinnebusch AG. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4):731–745.
158. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 11:597.
159. Bulleid NJ. (2012) Disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic

reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4(11):1–12.

160. Wakabayashi K, Nakagawa H, Tamura A, Koshihara S, Hoshijima K, Komada M, Ishikawa T. (2007) Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J. Biol. Chem.*, 282(38):27841–27846.

161. Aebi M. (2013) N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1833(11):2430–2437.

162. Nakagawa H, Nakagawa H, Tamura A, Koshihara S, Hoshijima K, Komada M, Ishikawa T. (2009) Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J.*, 276(24):7237–7252.

163. Kreitzer G, Marmorstein A, Okamoto P, Vallee R, Rodriguez-Boulant E. (2000) Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat. Cell Biol.*, 2:125.

164. Basseville A, Shukla S, Tamaki A, Robey R, Ambudkar SV, Bates SE. (2013) Characterization of the aggresome targeted Q141K ABCG2/BCRP variant. *Cancer Res.*, 73(8):2193–2193.

165. Basseville A, Tamaki A, Ierano C, Trostel S, Ward Y, Robey RW, Hegde RS, Bates SE. (2012) Histone deacetylase inhibitors influence chemotherapy transport by modulating expression and trafficking of a common polymorphic variant of the ABCG2 efflux transporter. *Cancer Res.*, 72(14):3642–3651.

166. Zelinski T, Coghlan G, Liu X-Q, Reid ME. (2012) ABCG2 null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat. Genet.*, 44(2):131–132.

167. Özvegy-Laczka C, Várady G, Köblös G, Ujhelly O, Cervenak J, Schuetz JD, Sorrentino BP, Koomen GJ, Váradi A, Németh K, Sarkadi B. (2005) Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 280(6):4219–4227.

168. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. (2002) The ABCG2 transporter is

an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2):507–512.

169. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. (2002) The multidrug resistance transporter ABCG2 (Breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin. Cancer Res.*, 8(1):22–28.

170. de Jong K, Kuypers FA. (2007) Flow cytometric determination of PMCA-mediated Ca^{2+} -extrusion in individual red blood cells. *Cytometry Part A*, 71(9):693–9.

171. Woodward OM, Tukaye DN, Cui J, Greenwell P, Constantoulakis LM, Parker BS, Rao A, Köttgen M, Maloney PC, Guggino WB. (2013) Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(13):5223–5228.

172. Richette P, Bardin T. (2010) Colchicine for the treatment of gout. *Expert Opin. Pharmacother.*, 11(17):2933–2938.

173. Rubenstein RC, Zeitlin PL. (1998) A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (buphenyl) in ΔF508 -homozygous cystic fibrosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157(2):484–490.

174. Awadalla P, Gauthier J, Myers RA, Casals F, Hamdan FF, Griffing AR, Côté M, Henrion E, Spiegelman D, Tarabeux J, Piton A, Yang Y, Boyko A, Bustamante C, Xiong L, Rapoport JL, Addington AM, Delisi JLE, Krebs MO, Joobor R, Millet B, Fombonne É, Mottron L, Zilvermit M, Keebler J, Daoud H, Marineau C, Roy-Gagnon MH, Dubé MP, Eyre-Walker A, Drapeau P, Stone EA, Lafrenière RG, Rouleau GA. (2010) Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am. J. Hum. Genet.*, 87(3):316–324.

175. Li M, Ho PWL, Pang SY, Tse ZHM, Kung MHW, Sham PC, Ho SL. (2014) PMCA4 (ATP2B4) Mutation in Familial Spastic Paraplegia. *PLoS One*, 9(8):e104790.

176. Timmann C, Thye T, Vens M, Evans J, May J, Ehmen C, Sievertsen J, Muntau B, Ruge G, Loag W, Ansong D, Antwi S, Asafo-Adjei E, Nguah SB, Kwakye KO, Akoto

- AOY, Sylverken J, Brendel M, Schuldt K, Loley C, Franke A, Meyer CG, Agbenyega T, Ziegler A, Horstmann RD. (2012) Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature*, 489(7416):443–446.
177. Bedu-Addo G, Meese S, Mockenhaupt FP. (2013) An ATP2B4 polymorphism protects against malaria in pregnancy. *J. Infect. Dis.*, 207(10):1600–1603.
178. Williams TN. (2006) Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(4):388–394.
179. Min-Oo G, Gros P. (2005) Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. *Cell. Microbiol.*, 7(6):753–763.
180. Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T, Garcia CRS. (2003) Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J. Cell Biol.*, 161(1):103–110.
181. Dluzewski AR, Fryer PR, Griffiths S, Wilson RJ, Gratzer WB. (1989) Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. *J. Cell Sci.*, 92(4):691–699.
182. Prasad V, Okunade G, Liu LI, Paul RJ, Shull GE. (2007) Distinct phenotypes among plasma membrane Ca^{2+} -ATPase knockout mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1099(1):276–286.
183. Lessard S, Gatof ES, Beaudoin M, Schupp PG, Sher F, Ali A, Prehar S, Kurita R, Nakamura Y, Baena E, Ledoux J, Oceandy D, Bauer DE, Lettre G. (2017) An erythroid-specific ATP2B4 enhancer mediates red blood cell hydration and malaria susceptibility. *J. Clin. Invest.*, 127(8):3065–3074.
184. Li J, Glessner JT, Zhang H, Hou C, Wei Z, Bradfield JP, Mentch FD, Guo Y, Kim C, Xia Q, Chiavacci RM, Thomas KA, Qiu H, Grant SF, Furth SL, Hakonarson H, Sleiman PM. (2013) GWAS of blood cell traits identifies novel associated loci and epistatic interactions in caucasian and African-American children. *Hum. Mol. Genet.*, 22(7):1457–1464.
185. Lesch M, Nyhan WL. (1964) A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.*, 36(4):561–570.

186. Gutman AB, Yü TF. (1957) Renal function in gout. *Am. J. Med.*, 23(4):600–622.
187. Kuo CF, Grainge MJ, See LC, Yu KH, Luo SF, Valdes AM, Zhang W, Doherty M.(2015) Familial aggregation of gout and relative genetic and environmental contributions: a nationwide population study in Taiwan. *Ann. Rheum. Dis.*, 74(2):369–374.
188. Bleyer AJ, Hart TC. (2006) Genetic factors associated with gout and hyperuricemia. *Adv. Chronic Kidney Dis.*, 13(2):124–130.
189. Krishnan E, Lessov-Schlaggar CN, Krasnow RE, Swan GE. (2012) Nature versus nurture in gout: a twin study. *Am J Med.*, 125(5):499–504.
190. Merriman TR. (2015) An update on the genetic architecture of hyperuricemia and gout. *Arthritis Res. Ther.*, 17(1):98.
191. Köttgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, Pistis G, Ruggiero D, O'Seaghdha CM, Haller T, Yang Q, Tanaka T, Johnson AD, Kutalik Z, Smith AV, Shi J, Struchalin M, Middelberg RPS, Brown MJ, Gaffo AL, Pirastu N, Li G, Hayward C, Zemunik T, Huffman J, Yengo L, Zhao JH, Demirkan A, Feitosa MF, Liu X, Malerba G, Lopez LM, van der Harst P, Li X, Kleber ME, Hicks AA, Nolte IM, Johansson A, Murgia F, Wild SH, Bakker SJL, Peden JF, Dehghan A, Steri M, Tenesa A, Lagou V, Salo P, Mangino M, Rose LM, Lehtimäki T, Woodward OM, Okada Y, Tin A, Müller C, Oldmeadow C, Putku M, Czamara D, Kraft P, Frogger L, Thun GA, Grotevendt A, Gislason GK, Harris TB, Launer LJ, McArdle P, Shuldiner AR, Boerwinkle E, Coresh J, Schmidt H, Schallert M, Martin NG, Montgomery GW, Kubo M, Nakamura Y, Tanaka T, Munroe, PB, Samani NJ, Jacobs Jr DR, Liu K, D'Adamo P, Ulivi S, Rotter JI, Psaty BM, Vollenweider P, Waeber G, Campbell S, Devuyst O, Navarro P, Kolcic I, Hastie N, Balkau B, Froguel P, Esko T, Salumets A, Khaw KT, Langenberg C, Wareham NJ, Isaacs A, Kraja A, Zhang Q, Wild PS, Scott RJ, Holliday EG, Org E, Viigimaa M, Bandinelli S, Metter JE, Lupo A, Trabetti E, Sorice R, Döring A, Lattka E, Strauch K, Theis F, Waldenberger M, Wichmann HE, Davies G, Gow AJ, Bruinenberg M; LifeLines Cohort Study, Stolk RP, Kooner JS, Zhang W, Winkelmann BR, Boehm BO, Lucae S, Penninx BW, Smit JH, Curhan G, Mudgal P, Plenge RM, Portas L, Persico I, Kirin M, Wilson JF, Leach IM, van Gilst WH, Goel A, Ongen H,

Hofman A, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Imboden M, von Eckardstein A, Cucca F, Nagaraja R, Piras MG, Nauck M, Schurmann C, Budde K, Ernst F, Farrington SM, Theodoratou E, Prokopenko I, Stumvoll M, Jula A, Perola M, Salomaa V, Shin SY, Spector TD, Sala C, Ridker PM, Kähönen M, Viikari J, Hengstenberg C, Nelson CP; Consortium CARDIoGRAM; Consortium DIAGRAM; Consortium ICBP; Consortium MAGIC, Meschia JF, Nalls MA, Sharma P, Singleton AB, Kamatani N, Zeller T, Burnier M, Attia J, Laan M, Klopp N, Hillege HL, Kloiber S, Choi H, Pirastu M, Tore S, Probst-Hensch NM, Völzke H, Gudnason V, Parsa A, Schmidt R, Whitfield JB, Fornage M, Gasparini P, Siscovick DS, Polašek O, Campbell H, Rudan I, Bouatia-Naji N, Metspalu A, Loos RJF, van Duijn CM, Borecki IB, Ferrucci L, Gambaro G, Deary IJ, Wolffenbuttel BHR, Chambers JC, März W, Pramstaller PP, Snieder H, Gyllenstein U, Wright AF, Navis G, Watkins H, Witteman JCM, Sanna S, Schipf S, Dunlop MG, Tönjes A, Ripatti S, Soranzo N, Toniolo D, Chasman DI, Raitakari O, Kao WHL, Ciullo M, Fox CS, Caulfield M, Bochud M, Gieger C. (2012) Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat. Genet.*, 45:145.

192. Wen CC, Yee SW, Liang X, Hoffmann TJ, Kvale MN, Banda Y, Jorgenson E, Schaefer C, Risch N, Giacomini KM. (2015) Genome-wide association study identifies ABCG2 (BCRP) as an allopurinol transporter and a determinant of drug response. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 97(5):518–525.

193. Giri AK, Banerjee P, Chakraborty S, Kauser Y, Undru A, Roy S, Parekatt V, Ghosh S, Tandon N, Bharadwaj D. (2016) Genome wide association study of uric acid in Indian population and interaction of identified variants with Type 2 diabetes. *Sci. Rep.*, 6:21440.

194. Kanai M, Akiyama M, Takahashi A, Matoba N, Momozawa Y, Ikeda M, Iwata N, Ikegawa S, Hirata M, Matsuda K, Kubo M, Okada Y, Kamatani Y. (2018) Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases. *Nat. Genet.*, 50(3):390–400.

195. Sulem P, Gudbjartsson DF, Walters GB, Helgadóttir HT, Helgason A, Gudjonsson SA, Zanon C, Besenbacher S, Björnsdóttir G, Magnusson OT, Magnusson G,

Hjartarson E, Saemundsdottir J, Gylfason A, Jonasdottir A, Holm H, Karason A, Rafnar T, Stefansson H, Andreassen OA, Pedersen JH, Pack AI, de Visser MCH, Kiemeny LA, Geirsson AJ, Eyjolfsson GI, Olafsson I, Kong A, Masson G, Jonsson H, Thorsteinsdottir U, Jonsdottir I, Stefansson K. (2011) Identification of low-frequency variants associated with gout and serum uric acid levels. *Nat. Genet.*, 43:1127.

196. Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, Sakiyama M, Shaukat A, Toyoda Y, Okada Y, Kamatani Y, Nakamura T, Takada T, Inoue K, Yasujima T, Yuasa H, Shirahama Y, Nakashima H, Shimizu S, Higashino T, Kawamura Y, Ogata H, Kawaguchi M, Ohkawa Y, Danjoh I, Tokumasu A, Ooyama K, Ito T, Kondo T, Wakai K, Stiburkova B, Pavelka K, Stamp LK, Dalbeth N, Sakurai Y, Suzuki H, Hosoyamada M, Fujimori S, Yokoo T, Hosoya T, Inoue I, Takahashi A, Kubo M, Ooyama H, Shimizu T, Ichida K, Shinomiya N, Merriman TR, Matsuo H. (2017) GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Ann. Rheum. Dis.*, 76(5):869–877.

197. Matsuo H, Yamamoto K, Nakaoka H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, Takahashi A, Nakamura T, Nakashima H, Takada Y, Danjoh I, Shimizu S, Abe J, Kawamura Y, Terashige S, Ogata H, Tatsukawa S, Yin G, Okada R, Morita E, Naito M, Tokumasu A, Onoue H, Iwaya K, Ito T, Takada T, Inoue K, Kato Y, Nakamura Y, Sakurai Y, Suzuki H, Kanai Y, Hosoya T, Hamajima N, Inoue I, Kubo M, Ichida K, Ooyama H, Shimizu T, Shinomiya N. (2016) Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann. Rheum. Dis.*, 75:652–659.

198. Chen CJ, Tseng CC, Yen JH, Chang JG, Chou WC, Chu HW, Chang SJ, Liao WT. (2018) ABCG2 contributes to the development of gout and hyperuricemia in a genome-wide association study. *Sci. Rep.*, 8(1):3137.

199. Takada T, Ichida K, Matsuo H, Nakayama A, Murakami K, Yamanashi Y, Kasuga H, Shinomiya N, Suzuki H. (2014) ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 33(4–6):275–281.

200. Ichida K, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T. (2012)

Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun.*, 3:764.

201. Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito K, Kusanagi Y, Chiba T, Tadokoro S, Takada Y, Oikawa Y, Inoue H, Suzuki K, Okada R, Nishiyama J, Domoto H, Watanabe S, Fujita M, Morimoto Y, Naito M, Nishio K, Hishida A, Wakai K, Asai Y, Niwa K, Kamakura K, Nonoyama S, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Hamajima N, Shinomiya N. (2009) Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci. Transl. Med.*, 1(5):5ra11.
202. Matsuo H, Takada, T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Takada Y, Okada C, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Shinomiya N. (2011) Identification of ABCG2 dysfunction as a major factor contributing to gout. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(12):1098–1104.
203. Sakiyama M, Matsuo H, Takada Y, Nakamura T, Nakayama A, Takada T, Kitajiri S, Wakai K, Suzuki H, Shinomiya N. (2014) Ethnic differences in ATP-binding cassette transporter, sub-family G, Member 2 (ABCG2/BCRP): genotype combinations and estimated functions. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 29(6):490–492.
204. Polgar O, Ediriwickrema LS, Robey RW, Sharma A, Hegde RS, Li Y, Xia D, Ward Y, Dean M, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B, Bates SE. (2009) Arginine 383 is a crucial residue in ABCG2 biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1788(7):1434–1443.
205. Khunweeraphong N, Stockner T, Kuchler K. (2017) The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Sci. Rep.*, 7(1):13767.
206. Zábó B, Bartos Z, Móznér O, Szabó E, Várady G, Poór G, Pálinkás M, Andrikovics H, Hegedus T, Homolya L, Sarkadi B. (2018) Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression. *Sci. Rep.*, 8(1):7487.
207. Stiburkova B, Miyata H, Závada J, Tomčík M, Pavelka K, Storkanova G, Toyoda

- Y, Takada T, Suzuki H. (2016) Novel dysfunctional variant in ABCG2 as a cause of severe tophaceous gout: biochemical, molecular genetics and functional analysis. *Rheumatology*, 55(1):191–194.
208. Morisaki K, Robey RW, Özvegy-Laczka C, Honjo Y, Polgar O, Steadman K, Sarkadi B, Bates SE. (2005) Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56(2):161–172.
209. László L, Sarkadi B, Hegedűs T. (2016) Jump into a new fold — a homology based model for the ABCG2/BCRP multidrug transporter. *PLoS One*, 11(10):e0164426.
210. Kim H, Kim SN, Park YS, Kim NH, Han JW, Lee HY, Kim YK. (2011) HDAC inhibitors downregulate MRP2 expression in multidrug resistant cancer cells: Implication for chemosensitization. *Int. J. Oncol.*, 38(3):807–812.
211. Hutt DM, Herman D, Rodrigues APC, Noel S, Pilewski JM, Matteson J, Hoch B, Kellner W, Kelly JF, Schmidt A, Thomas PJ, Matsumura Y, Skach WR, Gentzsch M, Riordan JR, Sorscher EJ, Okiyoneda T, Yates III JR, Lukacs GL, Frizzell RA, Manning G, Gottesfeld JM, Balch WE. (2009) Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat. Chem. Biol.*, 6:25.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

Zámbó B¹, Bartos Z¹, Móznér O, Szabó E, Várady G, Poór G, Pálinkás M, Andrikovics H, Hegedus T, Homolya L¹ & Sarkadi B¹. (2018) Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression. *Scientific Reports*, 8(1):7487.2.

¹Megosztott szerzők

IF= 4,122

Zámbó B, Várady G, Padányi R, Szabó E, Németh A, Langó T, Enyedi Á & Sarkadi B. (2017) Decreased calcium pump expression in human erythrocytes is connected to a minor haplotype in the ATP2B4 gene. *Cell Calcium*, 65:73–79.

IF= 3,718

11.2 Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

Várady G, Szabó E, Fehér Á, Németh A, Zámbó B, Pákáski M, Janka Z & Sarkadi B. (2015) Alterations of membrane protein expression in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.*, 1(3):334–338.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legnagyobb köszönettel és hálával témavezetőmnek, Dr. Sarkadi Baláznak tartozom, aki amellett, hogy biztosította kutatásaimhoz az anyagi háttérrel, végig odaadóan támogatott szakmailag is és rengeteg ötletével, kiváló gondolatával mindig elősegítette a munkámat. Elhivatottsága számomra is példa értékű volt. Még a kutatócsoport számára nehezebb időszakokban is pozitívan és számunkra iránymutató módon állt a kutatáshoz és a problémák megoldásához. Szerencsésnek érzem magam, hogy egy ilyen tapasztalt, nagy tudású, kiváló ember, kutató és vezető mellett dolgozhattam PhD éveim alatt.

Köszönettel tartozom Dr. Enyedi Ágnesnek, akivel az első elsőszerzős publikációmhoz kapcsolódó munkát közösen alkottuk meg. Élmény volt vele együtt dolgozni, innovatív ötletei mellett külön köszönöm neki a rengeteg biztató szót és segítséget, amit tőle kaptam. Emellett az egész Enyedi labor régi és új tagjainak is szeretném megköszönni az önfeledt és bátorító légkört, amit náluk mindig megtapasztalhattam.

Nagy köszönettel tartozom Bartos Zsuzsának, akivel a legtöbbet dolgoztam együtt a PhD-s éveim alatt. Kitartása és problémamegoldó személyisége engem is mindig átlendített a nehezebb időszakokon. Egy talpraesett munkatárs mellett egy nagyon jó baráttal is gazdagodtam általa.

Végtelen köszönettel tartozom a FACS laboratóriumban Dr. Várady Györgynek és Dr. Szabó Editnek, akik az első éveimben igazgatták a munkámat és beavattak az áramlási citometria rejtelseibe.

Hálával tartozom Dr. Homolya Lászlónak a közös munkáért és a szakmai támogatásáért.

Nagy-nagy köszönettel tartozom kooperációs partnereinknek az Országos Reumatológiai és Fiziológiai Intézetben, Dr. Poór Gyulának és Dr. Pálkás Mártonnak, a köszvényes mintákért és a szakmai támogatásért.

Szeretném megköszönni szakdolgozómnak, Mózner Orsolyának a rengeteg segítséget és lelki támogatást, amit tőle kaptam.

Hálásan köszönöm Dr. Hegedűs Tamásnak a bioinformatikai segítséget és rengeteg ötletet a közös munkánk során.

Szeretném megköszönni a vörösvértest projektben résztvevő minden önkéntesnek, akik vállalták az ujjbegyszúrással járó kellemetlenséget, ezzel lehetővé téve, hogy az eredményeim megszülethessenek. Szintén köszönettel tartozom az ORFI-ban önkéntes véradó donoroknak is, hogy beleegyezésüket adták a kísérletben való részvételhez.

Szeretném megköszönni az egész Biomembrán csoportnak a kiváló tudományos légkört. Ritka az olyan csoport, ahol bármilyen probléma esetén mindig találni valakit, aki önzetlenül segít. Fel sem tudnék mindenkit sorolni, aki az évek során támogatott engem.

Hálás köszönettel tartozom a kitartó és pótolhatatlan támogatásért családomnak: Édesanyámnak, Szalai Évának; Édesapámnak, Zámbó Bélának; Nővéremnek, Zámbó Virágnak; Édesapám feleségének és öcsikémnek, Salamon Boglárkának és Zámbó Vejkének a lelki támogatást.

Disszertációm nem jöhetett volna létre férjem, Gógl Gergő nélkül, aki végtelen türelemmel és gondoskodással segített a legnehezebb időszakokban is. Emellett szakmai beszélgetéseink során is rengeteg ötlettel támogatta a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban nagy köszönettel tartozom legközelebbi barátaimnak, Antal Annának és Kovács Ildikónak, akik egész szakmai pályafutásomat a gimnáziumtól kezdve végigkísérték és mindig mellettem álltak jóban-rosszban. Emellett minden barátomnak és családtagomnak szeretném megköszönni a türelmet, támogatást és megértést.